



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Evaluación microbiológica y anátomo patológica de la
osteomielitis del maxilar inferior en alpacas**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Salud Animal

AUTOR

Sergio Danilo PEZO CARREÓN

ASESOR

Raúl Héctor ROSADIO ALCÁNTARA

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Pezo S. Evaluación microbiológica y anátomo patológica de la osteomielitis del maxilar inferior en alpacas. [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria

UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO
DE MAGÍSTER EN SALUD ANIMAL**

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:30 horas del día lunes 27 de junio del 2016, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Mg. Alfredo Delgado Castro y constituido por los siguientes miembros: MSc. Alfonso Chavera Castillo, Dr. Raúl Rosadio Alcántara, Mg. Alberto Gustavo Manchego Sayán y la Mg. Nieves Sandoval Chaupe se dió inicio a la sustentación pública y oral de la Tesis intitulada:

**“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA Y ANATOMO PATOLÓGICA DE LA
OSTEOMIELITIS DEL MAXILAR INFERIOR EN ALPACAS”** presentado por el
Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia:

SERGIO DANILO PEZO CARREÓN

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación, obtuvo la calificación de: **BUENO (16) DIECISÉIS**

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó que la Facultad de Medicina Veterinaria proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Salud Animal al Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia Sr. **Sergio Danilo Pezo Carreón**

Siendo las 13:00 horas del día lunes 27 de junio del 2016, se dió por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....
Mg. Alfredo Delgado Castro (P.P.T.C.)
Presidente

.....
MSc. Alfonso Chavera Castillo (P.P.T.C.)
Miembro

.....
Dr. Raúl Hector Rosadio Alcántara (P.P.T.C.)
Miembro (Asesor)

.....
Mg. Alberto Manchego Sayán (P.P.D.E.)
Miembro

.....
Mg. Nieves Sandoval Chaupe P.P.D.E.)
Miembro

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.A.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria - UNMSM



DEDICATORIA

A la memoria de mi Padre
Rafael, que en la eternidad
me guía por el camino de la
corrección y perseverancia
para lograr mis caros anhelos.

A mi Madre Filomena mi eterna gratitud por su
constante sacrificio y confianza que me da en los
buenos y difíciles momentos de la vida.

A mis hermanos (a) Sonia, Elmer, Saúl, Darío
y Dante y a sus esposas(o) por su constante
apoyo incondicional.

Como ejemplo a mis adorados sobrinos

A mi esposa **Roxana**, mis hijos **Sergio Enrique** y
Gabriela Sofía quienes me dieron el aliento
necesario para concluir la Maestría.

A mis grandes amigos en la eternidad:
Enrique Franco Llaury y Virgilio Alarcón Bayona.

SERGIO DANILO

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue posible gracias al apoyo financiero y técnico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Facultad de Medicina Veterinaria - Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura..

Por sus valiosos aportes, asesoramiento y amistad a los Drs. (a) Raúl Rosadio, Sonia Calle Espinoza, Arnaldo Alvarado Sánchez, Alfredo Delgado Castro, Alfonso Chavera Castillo, Alberto Manchego Sayán, Nieves Sandoval Chaupe, Cesar Novoa Mostaceros (†) y Felipe San Martín Howard de la FMV UNMSM.

A mis amigos y compañeros de trabajo de la Estación IVITA Marangani Drs. Enrique Franco Llaury (†), Virgilio Alarcón Bayona (†), Walter Braga Loza, José Alva Mostaceros, Ing. Francisco Franco y al Sr. Santiago Condori Huarca por su permanente apoyo y colaboración.

A el personal del CICAS La Raya de la Universidad nacional San Antonio Abad del Cusco.

A todo el personal del IVITA Marangani por el constante apoyo brindado en el presente trabajo.

Eternamente agradecido

INDICE

INDICE	i
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
I INTRODUCCIÓN	9
II REVISION BIBLIOGRAFICA	11
2.1 Osteomielitis	11
2.2 Clasificación de la osteomielitis	11
2.3 Etiología de la osteomielitis.	12
2.3.1 Genero Arcanobacterium	14
2.3.2 Taxonomía	14
2.3.3 Características	15
2.3.4 Morfología de gránulos de azufre	16
2.3.5 Factores de virulencia	16
2.3.5.1 Hemolisina	16
2.3.5.2 Adhesinas	17
2.3.5.3 Formación de biopelículas.	18
2.3 Modo de transmisión de la osteomielitis	19
2.4 Fisiopatología	20
2.5 Signos clínicos	26
2.6 Tratamiento de osteomielitis de personas y alpacas	28
III MATERIAL Y METODOS	31
3.1 Lugar de ejecución.	31
3.2 Animales.	31
3.3 Materiales	31
3.4 Metodología.	32
3.4.1 Estudios clínicos	32
3.4.2 Estudios patológicos.	33
3.4.2.1 Estudios patológicos macroscópicos	33
3.4.2.2 Estudios histopatológicos	34

	3.4.3 Estudios microbiológicos	34
	3.4.4 Análisis de la información:	35
IV	RESULTADOS	36
4.1	Estudios clínicos	36
	4.1.1 Observaciones clínicas de osteomielitis alpacas adultas.	36
	4.1.2 Observaciones clínicas de osteomielitis en seis alpacas tuis.	40
	4.1.3 Observaciones clínicas de osteomielitis en crías de alpacas.	41
4.2	Estudios patológicos.	42
	4.2.1 Observaciones macroscópicas.	42
	4.2.1. 1 Observación de lesiones en 21 alpacas adultas.	42
	4.2.1. 2 Observación de lesiones en seis alpacas tuis.	47
	4.2.1. 3 Observación de lesiones macroscópicas en tres crías	47
	4.2. 2 Estudios Histopatológicos	49
4.3	Estudios microbiológicos	55
V	DISCUSION	62
VI	CONCLUSIONES.	70
VII	BIBLIOGRAFIA	71

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la osteomielitis del maxilar que presentaban 21 alpacas adultas, seis tuis y tres crías mediante el examen clínico, anatomopatológico, y microbiológico. La osteomielitis en alpacas es una inflamación ósea aguda-crónica progresiva, ocasionada por bacterias piógenas a través de una lesión inicial. La enfermedad se caracteriza por la presentación de lesiones de diferente grado mayormente en el maxilar inferior diagnosticadas clínicamente por inspección y palpación como engrosamientos, tumoraciones submandibulares con o sin ulceraciones. Esta enfermedad ocasiona severas pérdidas económicas en la crianza de alpacas debido a su carácter progresivo y debilitante. En todos los casos se hallaron lesiones de osteomielitis exclusivamente en el maxilar inferior y más frecuentemente en el maxilar izquierdo. Las lesiones leves son engrosamientos focalizados, mientras que las lesiones moderadas y graves son multifocales con la presencia de ulceraciones y fístulas directamente relacionadas a la gravedad de la lesión. A nivel histológico, la osteomielitis del maxilar inferior de las alpacas se observó como un proceso agudo, crónico primario y crónico secundario. Este proceso abarcó desde infiltrados inflamatorios compuestos por PMNs y células plasmáticas predominantemente acompañadas de un grado variable de fibrosis de la medula con rarefacción ósea y secuestros con involucro en los casos graves. La osteomielitis del maxilar inferior observada en el presente estudio es una enfermedad polimicrobial ocasionada por *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*. En crías de alpacas, además de las bacterias antes mencionadas se aisló el *Fusobacterium necrophorum*. En el presente estudio se concluye que la osteomielitis de las alpacas es una enfermedad debilitante, progresiva desde leve a grave, que afecta a cualquier edad, es polimicrobial e invasiva desde una lesión inicial y que conlleva a la muerte sobre todo en crías.

Palabras claves: Alpacas, *Arcanobacterium pyogenes*, osteomielitis, maxilar inferior,

SUMMARY

In the present study osteomyelitis in lower maxillary from 21 adult alpacas, six young alpacas (tuis) and three baby alpacas (crías) have been evaluated by clinical, anatomopatology and microbiological examination. Alpacas osteomyelitis in lower maxillary is acute-chronic progressive inflammation, caused by pyogenic bacteria through an initial injury. The disease is characterized by the presentation of different grade lesions in the maxillary; mostly appreciated by palpation or visually as thickening, maxillary tumors with or without ulceration. This disease causes severe economic losses in raising alpacas because of its progressive and debilitating character. In all cases, osteomyelitis lesions were found exclusively in the lower maxillary and more frequently in the left maxillary. Minor injuries are focused thickening, while moderate and severe multifocal lesions are the presence of ulcers and fistulas directly related to the severity of the injury. Histologically, osteomyelitis of the mandible of the alpacas was seen as an acute process, primary chronic and secondary chronic. This process lasted from inflammatory compounds infiltrated by PMNs and plasma cells predominantly accompanied by a variable degree of fibrosis of the bone marrow with rarefaction and kidnappings get involved in serious cases. Osteomyelitis of the maxillary observed in this study is a polymicrobial disease caused by *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In alpacas babys, besides the aforementioned bacteria, the *Fusobacterium necrophorum* was isolated. This study concludes that the osteomyelitis of the alpacas is a debilitating, progressive disease from mild to severe, affecting all ages, is polymicrobial and invasive from an initial injury that leads to death especially in youngs.

Keywords: Alpacas, osteomyelitis, lower jaw, *Actinomyces pyogenes*.

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Número de lesiones según localización, tipo y grado en 21 alpacas adultas con osteomielitis de la parte molar, espacio edéntulo y parte incisiva de las caras bucal y lingual del cuerpo mandibular izquierdo y derecho.
- Cuadro 2. . Numero de lesiones según localización, tipo y grado en 6 alpacas tuis con osteomielitis del maxilar inferior de la parte molar, espacio edéntulo y parte incisiva de las caras bucal y lingual del
- Cuadro 3. Lesiones macroscópicas de alpacas adultas con osteomielitis del maxilar inferior de la parte molar, espacio edéntulo y parte incisiva de las caras bucal y lingual del cuerpo mandibular izquierdo y derecho.
- Cuadro 4. Número de lesiones macroscópicas de alpacas tuis con osteomielitis de la parte molar del cuerpo mandibular caras bucal y lingual del maxilar inferior izquierdo y derecho y parte incisiva.
- Cuadro 5. Lesiones histológicas en el maxilar inferior de las alpacas (n=30) según grado.
- Cuadro 6. Frecuencia y porcentaje (n / %) de bacterias aisladas en la osteomielitis del maxilar inferior de alpacas adultas, tuis y crías.
- Cuadro 7. Características morfológicas y bioquímicas de bacterias aisladas del maxilar inferior de alpacas con osteomielitis

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1 Mandíbula vista rostro lateral izquierda.
- Figura2 Lesión de grado leve en la parte incisiva de una alpaca adulta (Flecha).
- Figura 3 Lesiones de grado moderado.
- Figura 4 Lesión fistulada moderada.
- Figura 5. Desviación del maxilar inferior.
- Figura 6 Fístula purulenta grave.
- Figura 7 Secuestros expuestos en la fístula.

Figura 8 Fístulas, engrosamiento y tumoraciones graves.

Figura 9. Fístula submandibular y engrosamiento (flecha) del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo en una alpaca tui.

Figura 10. Cría con engrosamiento y tumoración del cuerpo mandibular del maxilar inferior derecho.

Figura 11. Hiperostosis en la cara lingual y labial del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo de una alpaca adulta.

Figura 12. Lesión crónica con trayecto fistuloso purulento (flecha) e hiperostosis del maxilar izquierdo en una alpaca adulta.

Figura13. Lesión crónica en alpaca adulta, hiperostosis, rarefacción y necrosis en la cara bucal y lingual del maxilar izquierdo

Figura14. Lesión crónica continúa en una alpaca adulta: trayectos fistulosos purulentos que se abren en la piel.

Figura15. Hiperostosis y rarefacción ósea del maxilar inferior izquierdo de una alpaca adulta.

Figura16. Necrosis, secuestros, disolución ósea y fractura del maxilar inferior de una alpaca adulta.

Figura.17. Hiperostosis submandibular cría.

Figura18. Neoformación de tejido óseo cría.

Figura19. Piezas dentales rechazadas, porción basal descubierta e involucro con secuestros óseos y exudado purulento

Figura 20. Tejido óseo necrosado con exudado inflamatorio denso infiltrado H&E x 25.

Figura 21. Trabéculas de contorno irregular y zonas adiposas deformadas H&E 10X

Figura 22. Actividad osteoblástica entre la zona de hueso y la inflamada H&E 25X.

Figura 23. Trabéculas del hueso revestidas por osteoblastos. H&E 40X

Figura 24. Presencia de plasmocitos, fibroblastos y tejido fibroso dispersos. H&E 40X

Figura 25. Formación reactiva perióstica del tejido óseo. H&E 10X

Figura 26. Células inflamatorias PMNs infiltradas en un micro absceso. H&E 10X.

Figura 27. Colonias de *Arcanobacterium pyogenes*

Figura 28. Bacterias de *Arcanobacterium pyogenes*.

Figura 29. Granulo de azufre.

Figura 30. Colonias *Staphylococcus aureus*.

Figura. 31. Bacterias de *Staphylococcus aureus*.

Figura 32. Colonias *Streptococcus. pyogenes* beta hemolíticas (Izquierda) y *Streptococcus viridans* alfa hemolíticas (Derecha)

Figura 33. Bacterias de *Streptococcus pyogenes*

Figura 34. Bacterias de *Streptococcus viridans*

Figura 35. Colonias de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Figura 36. Bacterias de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Figura 37. Colonias de *Fusobacterium necrophorum*

Figura 38. Bacterias filamentosas de *Fusobacterium necrophorum*

ABREVIATURAS

CD	Marcadores específicos.
COX-2	Ciclooxigenasa - 2
FNT	Factor de necrosis tumoral
H ₂ S	Sulfuro de hierro.
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL 6	Interleucina IL6
IL1	Interleucina IL1
LT	Linfotoxina
M CSF	Factor estimulantes de colonias de macrófagos
OPG	Osteoprotegerina,
PGE ₂	Prostaglandina E ₂ alfa
PL	Hemolisina pyolysin

PMN	Polimorfonucleares
RANK	Receptor activador de NkB
RANK-L	Receptor activador de NFkB ligando
SAMR-AC	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistentes adquiridos en la comunidad
MLSB	Macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B
SIM	Medio de agar citrato de Simmons
TSI	Medio agar hierro tres azúcares.
VRE	Vancomicina-resistentes enterococcus

I INTRODUCCIÓN

La osteomielitis del maxilar en alpacas es una enfermedad endémica que afecta a animales de diferente edad, raza, sexo, color, ocasionando severas pérdidas económicas a los pequeños productores alpaqueros debido a la pobre producción de fibra y pérdida progresiva de la condición corporal, y destino final debido a la saca de animales de alto valor genético (Cuba, 1949; Moro, 1956; Franco *et al.*, 1998; Ramírez, 1998). La osteomielitis presenta amplia distribución, escasa respuesta al tratamiento, morbilidad elevada y costos para el sistema sanitario (Acha y Szyfres, 2001; Calhoun *et al.*, 2009; Pezo *et al.*, 2014). La osteomielitis se presenta esporádicamente en los hatos alpaqueros afectados y se desconoce la incidencia y prevalencia de esta enfermedad a nivel de productor, ya que no se llevan registros de mortalidad y morbilidad en estos rebaños. La información de Centros Experimentales reportan porcentajes de 2.9, 5.9 y 18.4% en crías, tuis y adultos respectivamente (Ramírez, 1991).

La osteomielitis en alpacas ha sido descrita como una inflamación ósea ocasionada generalmente por agentes septicémicos como *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Corynebacterium pyogenes* y *Staphylococcus* spp. (Lovón, 1995; Moro, 1956). Cuba, 1949 examinó un total de 542 maxilares de alpacas, encontrando lesiones de diferente grado en el maxilar inferior de 43 animales (7.9%). En 17 de estos casos mostraban tumoraciones submandibulares con ulceraciones (39.5%), 8 casos mostraban lesiones submandibulares sin ulceración, y en 15 casos se encontraron engrosamientos de al menos una de las ramas del maxilar, lesiones que se consideró como inicio de la enfermedad. En el maxilar superior solo se encontraron dos casos que mostraron lesiones ulceradas (4.6%) y un caso sin lesión ulcerada.

En los camélidos sudamericanos se desconocen los posibles mecanismos patogénicos de las bacterias osteotrópicas. El *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* es una bacteria saprofítica de la cavidad oral (Blood y Radostits, 1986) que al parecer aprovecha las lesiones locales para iniciar su adherencia, penetración tisular y activar propiedades osteolíticas y osteogénicas (Jubb *et al.*, 1993). El *Corynebacterium pyogenes* es una bacteria piogénica, que atrae células fagocíticas que liberan enzimas proteolíticas aumentando factores inflamatorios que podrían ocasionar lisis y necrosis ósea (Barne y Brothwell, 1987). La necrosis ósea es producto de una serie de factores que incluyen

toxinas bacteriales y enzimas liberadores neutrofílicos. La reabsorción y proliferación ósea son eventos posteriores a la necrosis y al parecer son consecuencia de factores biológicos asociados con procesos inflamatorios que activan capacidades osteoblásticas y osteoclásticas (Allen *et al.*, 1981).

En el presente estudio se evaluó la osteomielitis del maxilar inferior en alpacas mediante estudios clínicos, anátomo patológicos, y microbiológicos, con el objetivo de caracterizar las lesiones y describir los agentes etiológicos involucrados en esta enfermedad.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Osteomielitis

La osteomielitis es una inflamación caracterizada por la destrucción progresiva del hueso, con necrosis y formación de un nuevo hueso rarefaciente. Es generalmente causada por una infección de origen bacteriano, aunque puede ser también originada por cualquier microorganismo, sean hongos o parásitos. La osteomielitis afecta al hueso, médula, corteza, periostio, vasos sanguíneos, nervios y engloba en un inicio las partes blandas; las cuales pueden estar afectadas en forma individual o conjunta. La característica principal de la osteomielitis de los maxilares es la falta de límites anatómicos en la localización del proceso inflamatorio (Cuba, 1949; Moro, 1956; Lew y Waldvogel, 2004; Marais *et al.*, 2013). En la osteomielitis influyen diversos factores tales como la disfunción de las células fagocíticas, la pérdida en la continuidad de los endotelios, la disminución en el flujo sanguíneo capilar, la disminución en las concentraciones tisulares de oxígeno, la exposición del colágeno a microorganismos, la acción de los metabolitos del ácido araquidónico y prostaglandina E2. Estos factores juegan papeles significativos para el desarrollo de la infección (Rodríguez, 2000; Gutiérrez, 2005; Baltensperger y Eyrich, 2009).

2.2 Clasificación de la osteomielitis.

La osteomielitis se puede clasificar según la duración (aguda o crónica), patogenia (trauma, extensión contigua, hematógena, quirúrgica), sitio, medida o tipo de paciente. Sin embargo, las dos clasificaciones más ampliamente aceptadas en la práctica clínica son aquellas descritas por Waldvogel y Cierny-Mader (Calhoun *et al.*, 2009). Waldvogel clasifica la osteomielitis en tres pasos: primero según la duración, ya sea aguda o crónica.; en segundo lugar según la fuente de infección hematógena, debido a una bacteriemia o por extensión de un foco contiguo en un tejido cercano y en tercer lugar se clasifica según una insuficiencia vascular. Sin embargo el sistema de clasificación de Waldvogel no considera una infección originada por la penetración directa de los microorganismos en el hueso (Calhoun *et al.*, 2009).

La clasificación de Cierny-Mader comprende cuatro etapas: 1ra, limitada a la cavidad medular del hueso; 2da, o superficial, involucra sólo el hueso cortical por inoculación directa o una infección desde un foco contiguo; 3ra, o localizada, involucra tanto la zona cortical y medular del hueso y la 4ta, o difusa, la osteomielitis involucra todo el espesor del hueso. Cierny-Mader caracteriza además al hospedero como A, B o C. A son pacientes sin factores de compromiso sistémico o local, B son afectados por uno o más factores y C, son pacientes severamente comprometidos con un tratamiento radical (Cierny *et al.*, 1985). Un déficit de este sistema es que, por definición, la categoría de hospedero C es una evaluación subjetiva. También otra característica que no se tiene en cuenta es la duración de tiempo que una infección ha sido capaz de persistir (Calhoun *et al.*, 2009).

La heterogeneidad de los sistemas de clasificación de la osteomielitis mandibular se define y describe según criterios de etiología y patogénesis, curso y presentación clínica, y radiología, e histopatología. Además, la mayoría de formas de clasificación combinan estos criterios, creando confusión en estudios comparativos. Por esta razón, el Departamento de cirugía cráneo-maxilofacial en la Universidad de Zúrich utiliza un orden jerárquico de criterios de clasificación (Baltensperger y Eyrich, 2009). Este orden se basa en el curso y apariencia clínica de la enfermedad, así como también en las características radiológicas. Según estos criterios la osteomielitis se clasifica como osteomielitis aguda (OA), osteomielitis crónica secundaria (OCS), y osteomielitis crónica primaria (OCP).

2.3 Etiología de la osteomielitis.

La osteomielitis de foco continuo presenta frecuentemente infecciones bacterianas como por *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Streptococcus* spp., bacilos gram-negativos y bacterias anaerobias. En el hombre el *Actinomyces israelii* es el principal agente etiológico de la osteomielitis en los maxilares inferior y superior (Acha y Szyfres, 2001).

En personas adultas la infección comienza por un trauma en la encía de la región periodontal de los molares y premolares, siendo el *Staphylococcus aureus* el aislamiento más común en el hueso; (Lew y Waldvogel, 2004; Aparicio *et al.*, 2007).

Ali *et al.*, (2012), reportaron infecciones mixtas con predominio de *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, y *Streptococcus sobrinus*,

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. También se identificaron bacterias anaeróbicas estrictas del género: *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*. La participación de bacterias anaerobias en las osteomielitis parece ser más frecuente de lo que se pensaba, sobre todo en osteomielitis de los huesos de la cara. La infección mixta es más frecuente en las osteomielitis crónicas (Aguado, 2002; Santala *et al.*, 2004; Schaal, 2006)

En recién nacidos, las bacterias que frecuentemente ocasionan infecciones óseas son: *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del Grupo B), *Staphylococcus aureus* y los bacilos entéricos aeróbicos. Excepcionalmente se han descrito infecciones por *Staphylococcus epidermidis*. En osteomielitis en niños de mayor edad, el *Staphylococcus aureus* es el microorganismo más identificado, seguido por el *Streptococcus pyogenes* (Grupo A) y el *Streptococcus pneumoniae* (Merino *et al.*, 2001; Gutiérrez, 2005).

En ciervos Duiker azul (*Cephalophus monticola fuscicolor*) fueron aisladas de abscesos faciales y mandibulares bacterias aeróbicas y anaeróbicas: *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes*, *Fusobacterium necrophorus*, *Bacteroides* sp, *Streptococcus* sp, *Lactobacillus*, y *Staphylococcus* sp. En un grupo cautivo de antílopes de la india (*Antelope cervicapra*) se aisló *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* asociado a osteomielitis mandibular, neumonía, peritonitis y abscesos hepáticos, pulmonares, renales y subcutáneos (Roeder *et al.*, 1989). En bovinos y porcinos la osteomielitis se ha asociado a septicemias causadas por *Actinomyces bovis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Mycobacterium* sp, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, y *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* (Barne y Brothwell, 1987; Blood y Radostits, 1986; Clerc *et al.*, 2004).

La osteomielitis en alpacas ha sido descrita como una inflamación ósea ocasionada generalmente por agentes bacterianos como: *Actinomyces* sp, *Streptococcus* sp, *Fusobacterium* sp, *Corynebacterium pyogenes* y *Staphylococcus hemolitico*. También se aislaron otras bacterias tales como *Streptococcus zooepidemicus*, levaduras y *Clostridium welchii*. De la secreción bucal se aisló *Staphylococcus aureus*, *Diplococos* gram negativos y *Bacillus cereus*, este último descrito como contaminante oportunista (Lovón, 1955; Moro y Guerrero, 1971; Fowler, 1995; Fernández y Rosadio 1998)

2.3.1 Género *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*

Los agentes etiológicos de la actinomicosis fueron descubiertos por Bollinger y Hartz en 1877 y obtenidos en cultivo puro por Wolf, Israel y Boström, en 1891 (Schaal *et al.*, 2006). El género *Actinomyces* comprende un grupo heterogéneo de bacterias que contienen un ADN de Guanina – Citosina (G _ C) de 55 a 71% mol. (Hall, *et al.*, 2001). Este género *Actinomyces*, fue reclasificado de *Corynebacterium pyogenes* a *Actinomyces pyogenes* (Reddy, 1982). En la actualidad el *Actinomyces pyogenes* se reclasificó a *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* cuya composición base es ADN de 56 a 58 mol % G + C (Ramos *et al.*, 1997)

2.3.2 Taxonomía

La taxonomía actual se basa en la delimitación de ADN ribosomal 16S (ADNr), al análisis de secuencias de proteínas de perfiles de células enteras, y una amplia gama de características fenotípicas (Hall, *et al.*, 2001; Sarkonen, *et al.*, 2001). De acuerdo al manual Bergey de Microbiología Sistemática (Garrity *et al.*, 2004) se le asigna la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio: *Bacteria*

Phylum: *Actinobacteria*

Clase: *Actinobacteria*

Sub clase *Actinobacteridae*

Orden: *Actinomycetales*

Familia: *Actinomycineae*

Género: *Arcanobacterium*

Especie: *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*

2.3.3 Características

Las especies patógenas de *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* son comensales y habitantes comunes de la boca, faringe, tracto gastrointestinal, y genital de la hembra en humanos y animales. La actinomicosis en ganado, caballos, y otros animales se debe usualmente a *Actinomyces bovis*, el cual se aísla con frecuencia de una amplia variedad de enfermedades piógenas (Smego y Foglia, 1998; Acha y Szyfres, 2001).

Son cocobacilos gram positivos, inmóviles, no forman esporas y presentan varillas cortas en pares (V, T y las formaciones de empalizada), o en racimos, y además se observan formas cortas diphteroides. Ocasionalmente, tienen formas estreptocócicas en pequeños grupos y cadenas cortas torcidas. Las células varían en tamaño y forma (0,2 a 0,9 por 0.3 a 2.5 μm) en diferentes medios de cultivo; en agar sangre de cordero se observan colonias β -hemolítica puntiformes luego de 24 h de incubación. Las zonas de hemólisis son típicas y abarcan de dos a tres veces el diámetro de la colonia. Después de 48 a 72 h, las colonias son de 0,5 a 1,5 mm, de diámetro, convexas, circulares, opacas, blancas y con bordes enteros. Tiene buen crecimiento bajo condiciones aerobias y anaerobiosis estricta. Son ácidas sin producir gas, producen glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, celobiosa, trehalosa, maltosa, manosa, glucógeno, dextrina, xilosa e hidrolizan la caseína, la gelatina y el almidón. La mayoría de las cepas son catalasa negativa. La temperatura óptima de crecimiento es de 37° C con un rango de 20 a 40° C (Reddy *et al.*, 1982; Morrison y Tillotson, 1988; Sarkonen *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2005).

En agar infusión cerebro-corazón (BHI-agar) *Actinomyces bovis*, o *A. odontolyticus* desarrolla colonias como “arañas” con filamentos blanquecinos periféricos extendidos y de difícil separación del medio. *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii* y *A. viscosus* en cambio forman microcolonias suaves sin filamentos blanquecinos. Aunque, la morfología colonial es referencial, la confirmación de *Actinomyces* sp. depende de su fisiología y pared celular (Lechevalier y Lechevalier, 1970; Serrano, 2005). La diferenciación de *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* y *Actinobaculum* de otros géneros puede ser muy difícil sin la demostración de ácido succínico como productos finales metabólicos. Además de ácido succínico, los géneros *Actinomyces* y *Actinobaculum* producen ácido acético y el género *Actinomyces* produce cantidades considerables de ácido láctico. La reducción de nitrato, la producción de catalasa y la producción de – NAG galactosidasa, y xilosidasa - son pruebas importantes para la diferenciación de estos tres géneros. (Ramos *et al.*, 1997; Sarkonen *et al.*, 2001; Vadillo *et al.*, 2002)

2.3.4 Morfología de gránulos de azufre

Las colonias bacterianas forman gránulos actinomicóticos o gránulos amarillentos en el material purulento de la zona afectada descritos como “gránulos de azufre” de consistencia más o menos dura. Estos gránulos están compuestos de agregados densos o masas en forma de rosetas de bacterias filamentosas, asociadas o no a formas bacilares o difteroides pleomórficas gram positivas. Las rosetas individuales suelen tener un diámetro de 30 a 40 μm , pero a veces llegan a 200 μm , y los pequeños gránulos amarillos, visibles a simple vista, pueden estar constituidos por una o varias rosetas compuestas por un núcleo central de filamentos ramificados dispuestos radialmente, con cuerpos periféricos refringentes en forma de masa y cuerpos esféricos similares a los cocos (Bestetti, 1978; Pritt *et al.*, 2006). La formación de estas masas en los tejidos es debido a una respuesta antígeno-anticuerpo del huésped similar al fenómeno de Splendore-Hoepli, que ocurre alrededor de bacterias u hongos impidiendo la fagocitosis y destrucción del agente lo que permite prolongar la infección. El conjunto llamado actinomicoma o drusa, con aspecto de roseta está además constituida por fosfato cálcico, rodeando los filamentos y son el resultado de la actividad de fosfatasa alcalina del agente y la reacción del hospedador a la infección. (Pine y Overman, 1963; Vadillo *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2014)

2.3.5 Factores de virulencia

2.3.5.1 Hemolisina

El pyolysin (PLO) es una hemolisina que favorece la sobrevivencia del *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* durante las etapas tempranas de la infección protegiéndolo de la respuesta inmune del hospedero. Se trata de una toxina extracelular responsable de la beta hemólisis de los cultivos con glóbulos rojos. Además es citolítica para varios tipos celulares, incluyendo polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) y macrófagos; es dermonecrótica y letal para los animales de laboratorio mediante la vía intravenosa e intraperitoneal. El PLO es producido por todas las cepas de *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes* examinadas y se expresa como una proteína de 55 kD

principalmente en la fase estacionaria en el sobrenadante de los medios (Billington *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1997; Jost *et al.*, 2003).

2.3.5.2 Adhesinas

Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes posee neuraminidasa, que es requerida por su amplitud de adhesión a células epiteliales, y diversas proteínas de unión a sustancias extracelulares. También es requerida para la adhesión al tejido sustancioso, colágeno y adherencia interbacterial entre cepas de *Actinomyces viscosus* y cepas de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Pseudomonas aeruginosa*. La neuraminidasa ha sido probada mediante reacciones de inhibición de la lactosa por calentamiento vinculándola con una adhesina galactosyl propia del *Actinomyces viscosus* (Gibbons y Hay, 1988; Jost y Billington 2005). La neuraminidasa promueve la adherencia de *Streptococcus pneumoniae* y *Actinomyces* sp a las células epiteliales orales, al exponerse a receptores de las células del huésped la neuraminidasa también puede disminuir la viscosidad del moco, posiblemente para mejorar la colonización bacteriana de los tejidos subyacentes. La neuraminidasa además impide la respuesta inmune del huésped, aumentando la susceptibilidad de la IgA de las mucosas a las proteasas bacterianas (Gibbons *et al.*, 1988; Drobni *et al.*, 2006).

Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes expresan fimbrias (pili), similares a las de tipo 2 de *Actinomyces naeslundii*. Las fimbrias son apéndices filamentosos, proteínicos y superficiales importantes en la adhesión a la superficie celular o intercelular de numerosas bacterias Gram negativas. Solo unos pocos organismos Gram positivos como *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*, algunos *Streptococcus* sp orales, y *Corynebacterium* sp., poseen fimbrias de entre 200 a 700 nm de longitud y de 2.5 a 4,5 nm de ancho (Jost y Billington, 2005).

Se presume que las fimbrias de *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* están involucradas en la adhesión al huésped, posiblemente mediante la unión a la fibronectina a través de FimB. En experimentos preliminares de Western Blot con antígenos recombinantes del FimA se ha determinado que los sueros de los bovinos infectados naturalmente llevan anticuerpos contra esta proteína, indicando la expresión in vivo. Sin embargo, los detalles precisos de la función de las fimbrias en la adherencia del

Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes y su participación en la patogénesis requieren más aclaración (Wu *et al.*, 2011; Bicalho *et al.*, 2012).

2.3.5.3 Formación de biopelículas.

Las biopelículas están constituidas por comunidades de microorganismos que se concentran en una interface sólido/líquido y normalmente están rodeadas por una matriz extracelular poli molecular de diferentes fenotipos celulares lo que permite a las bacterias defenderse mejor de embates físicos, químicos, y resistir la fagocitosis. Además proveen mayor resistencia a ciertos agentes antimicrobianos como fibrinógeno, fibrina, osteopontina, fibronectina, colágeno, elastina. Las biopelículas están siendo implicadas en la patogenia de las infecciones persistentes o crónicas como periodontitis, fibrosis quística, endocarditis, otitis media crónica, osteomielitis y mastitis bovina (Archer *et al.*, 2011; Marais *et al.*, 2013). La flora polimicrobiana residente de bacterias simbióticas o comensales y la defensa innata de la saliva, consisten en una matriz de proteínas polimórficas y multifuncionales de polipéptidos, péptidos, glicoproteínas y mucinas que intervienen en el control de la colonización bacteriana foránea. Las proteínas salivales son ricas en prolina, compuestos de péptidos y pentapéptido, y mediante una interacción hospedero-bacteria afectan los mecanismos invasores de adherencia, proliferación y pH previniendo la formación de placas bacterianas compuestas por géneros de *Streptococcus* y *Actinomyces*; así como de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, en la osteomielitis ocurre una gran inoculación bacteriana en combinación con el trauma, la necrosis e isquemia del tejido o la presencia de materiales extraños. Las células hospedadoras se esfuerzan por establecer una capa celular protectora integrada con mecanismos de defensa innata y la lesión es invadida por PMNs (Drobni *et al.*, 2006; Archer *et al.*, 2011).

El *Streptococcus gordonii* es un comensal que utiliza prolina salival para generar un pentapéptido que estimula su proliferación estabilizando el medio a un pH neutro para su crecimiento óptimo, afectando a su vez la adherencia, proliferación y pH de la formación de placa bacteriana del *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* y bacterias cariogénicas que compiten por los receptores del pentapéptido. Se menciona que existen otros péptidos que pueden combatir enfermedades infecciosas como el tripéptido que inhibe infecciones estreptocócicas en vivo, y el péptido P1025 que podría inhibir la adherencia y colonización del *Staphylococcus mutans* (Drobni *et al.*, 2006)

2.3 Modo de transmisión de la osteomielitis

Las periodontitis se incluyen entre las enfermedades que mayor relación tienen con un desequilibrio del ecosistema oral, y predispone al predominio de flora bacteriana patógena (aerobia y anaerobia). Según este desequilibrio, algunas bacterias comensales pueden llegar a convertirse en patógenas oportunistas. Las condiciones anatómicas del espacio gingival dental hacen que sea uno de los sub-ecosistemas de mayor interés en relación con la aparición de procesos infecciosos de etiología mixta. Otros factores físicos como la temperatura, humedad, pH, y el bajo potencial de óxido-reducción del espacio gingival dental, especialmente cuando se asocia con una placa bacteriana sub-gingival, explican el predominio de bacterias anaerobias y su implicación en procesos peri-dentales patógenos (Mustafá *et al.*, 2014). Como resultado de la extensión de la infección odontógena la osteomielitis puede generarse en el maxilar o en la mandíbula por vía directa -diente y tejidos periodontales- o indirecta -hemática y linfática-. La vía directa ocurre por continuidad, sobre todo entre el primer y segundo molar, como infecciones pulpares (caries, granulomas, periodontitis), enfermedad periodontal, alteración de las estructuras periodontales, y de las mucosas ocasionando pericoronaritis y gingivo-estomatitis úlcero necrotizante (Rodríguez, 2000).

En los animales *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* vive normalmente en las mucosas de las partes altas de los aparatos respiratorio y digestivo, y ha sido hallado en el sarro dentario y en los restos de alimentos de las encías. El papel de las aristas de las espigas de plantas duras en la infección es puramente mecánico que al penetrar en los tejidos blandos de la cavidad bucal originan una necrosis primaria, esencial para el desarrollo del germen. En bovinos los pastos duros penetran en los espacios alveolares dentales de la mandíbula o maxilar, o también por traumatismos de la mucosa durante la muda dental en animales jóvenes. (Vadillo *et al.*, 2002; Clerc *et al.*, 2004). *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* es aislado frecuentemente de síndromes iatrogénicos como la sinusitis frontal posterior al descorne, abscesos en puntos de inyección y heridas quirúrgicas; en rebaños con manejo intensivo en donde se produce una formación extensa de abscesos subcutáneos y celulitis supurativa por las abrasiones cutáneas. En infecciones inducidas experimentalmente en ratones, se observó que el *Staphylococcus aureus* lleva un curso crónico y puede afectar a todo el organismo,

causando infección y abscesos en varios tejidos y órganos (Blood y Radostits, 1986; Li *et al.*, 2008)

En alpacas se ha observado que las heridas de la mucosa bucal son causadas por el consumo de pastos duros y se relacionan con la presentación de un proceso supurativo crónico con abultamiento uni o bilateral del maxilar inferior. Este proceso puede ser de semanas, meses a más; la proliferación de la bacteria da como resultado una reacción granulomatosa/supurativa que afecta al hueso produciendo una osteítis rarefaciente. Hasta la fecha no se ha podido aclarar porque el microorganismo comensal causante se transforma en una bacteria invasora patógena (Cuba, 1949; Moro y Guerrero, 1971; Pezo *et al.*, 1996)

2.4 Fisiopatología

Los factores asociados con la patogénesis de la osteomielitis incluyen la virulencia del organismo, el estado inmune, comorbilidades del paciente, y el hueso afectado; el microorganismo llega al hueso por diseminación hematógena, por la propagación de un foco contiguo de infección, o por una herida penetrante (Labbe *et al.*, 2010). Cuando un microorganismo causa una inflamación aguda en el hueso, se liberan múltiples factores inflamatorios y leucocitos; los canales vasculares se obliteran por el proceso inflamatorio, aumenta la presión intraósea, se genera éstasis sanguínea, y trombosis, con la subsecuente necrosis ósea. Esto se asocia a destrucción cortical, elevación del periostio, y a propagación de la infección al tejido adyacente. La infección crónica generalmente es el resultado de una infección aguda no tratada o una infección de baja virulencia que se manifiesta como extensa esclerosis ósea, o en la formación de sequestro (hueso necrótico), involucro (formación de hueso perióstico alrededor del sequestro), o una fistula (Lew y Waldvogel, 2004; Calhoun *et al.*, 2008).

Staphylococcus aureus es el patógeno más común aislado este se adhiere a múltiples componentes de la matriz ósea, incluyendo fibrinógeno, fibronectina, colágeno, vitronectina, trombospondina, elastina entre otros. Esta adhesión está mediada por las adhesinas de la superficie bacteriana, así mismo posee también múltiples formas de evadir las defensas del huésped; por ejemplo la proteína A que es un componente de la pared celular con propiedad antifagocítica; el *Staphylococcus aureus* induce la liberación de factores catabólicos tales como TNF - α , Prostaglandinas, e interleucina, que contribuyen

a la osteolisis. Se ha descrito que bacterias como el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* del grupo A, y *Pseudomonas aeruginosa*, pueden formar biopelículas que dificultan la erradicación del microorganismo. La biopelícula es una barrera física para las células fagocíticas, así como para el agente antimicrobiano, imposibilitando alcanzar el organismo (Lew y Waldvogel, 2004; Calhoun *et al.*, 2008).

La osteomielitis se extiende desde la médula hasta los espacios óseos esponjosos a través de los vasos sanguíneos, los tejidos fibroelásticos y eventualmente alcanza el periostio. Siendo el hueso un tejido vivo si la nutrición de las células óseas disminuye, estas mueren y se forma un sequestro. El maxilar inferior suele ser el más afectado debido a estar menos vascularizado, y por poseer menos zonas esponjosas que el maxilar superior el cual además es de un aspecto óseo laminar que le confiere mayor protección. La región de los incisivos del maxilar inferior posee además una vascularización yuxtaterminal, lo que favorece la formación de grandes sequestros (Rodríguez, 2000).

El maxilar del lactante contiene una gran irrigación vascular, y son zonas extraordinariamente ingurgitadas que atraen gérmenes como punto de implantación hematogena o bien por extensión desde un proceso cutáneo vecino. Debido al rico suministro vascular, la metáfisis del hueso está más a menudo involucrada en un proceso de osteomielitis, en donde la bacteria que infecta llega a través de los capilares, causando una inflamación local y se adhieren a la matriz cartilaginosa evadiendo las defensas, y se establece persistentemente en el hueso (Gutiérrez, 2005, Asgary *et al.*, 2012).

Cuando ocurre osteomielitis de carácter más o menos intensa, el peligro es el sequestro de grandes fragmentos. Debido a las trombosis vasculares o endoarteritis, o bien de los reflejos vegetativos simpáticos y parasimpáticos se produce una vasoconstricción de los vasos mandibulares de tipo terminal, dando origen y facilitando la aparición de necrosis y sequestros. El examen por microscopia electrónica de los vasos capilares metafisiarios ha demostrado que los vasos distales están compuestos de una sola capa de endotelio discontinua a través del cual es posible que las bacterias puedan pasar a través de estos espacios durante un episodio septicémico iniciando así la osteomielitis. Además, los capilares metafisiarios carecen de revestimiento de células fagocíticas, y las venas sinusoidales contienen células fagocíticas funcionalmente inactivas, los cuales permiten

el crecimiento de microorganismos. Cualquier forma de obstrucción capilar final, incluyendo un pequeño hematoma como resultado de un trauma menor, podría producir una zona de necrosis vascular predispuesta a la infección. (Rodríguez, 2000; Calhoun *et al.*, 2008)

La función metabólica del tejido óseo guarda una relación estrecha con la osteomielitis a través de tres mecanismos: 1) Equilibrio entre niveles sanguíneos y sales minerales del hueso a través de la secreción de paratohormona (PTH), calcitonina y calcio. 2) Osteoclasia o reabsorción de la matriz ósea mineralizada por parte de los osteoclastos. 3) Osteólisis o reabsorción de la matriz ósea mineralizada alrededor de los osteocitos. El principal hallazgo histopatológico de la osteomielitis lo constituye la presencia de bacterias, infiltración de los neutrófilos y la congestión o trombosis en el sistema vascular (Rodríguez, 2000)

Los osteoblastos pueden producir varios factores solubles que modulan la actividad o la formación de osteoclastos. El activador del receptor de ligando NF-B (RANK-L) y prostaglandina E2 (PGE2) son dos moléculas que pueden promover osteoclastogénesis y estimulan la resorción ósea. Se han observado niveles elevados de RANK-L en lesiones óseas mandibulares de osteomielitis. Se ha demostrado que los osteoblastos producen citoquinas inflamatorias, como IL 6 después de una infección con *Staphylococcus aureus*, lo cual podría inducir a la mayor producción de ciclooxigenasa (COX-2) y PGE2, aparte de la acción modulante y diferenciación en osteoclastos. (Somayaji *et al.*, 2008)

El remodelado óseo es un proceso fisiológico cíclico continuo, que garantiza la conservación y la renovación de la matriz ósea. Sin embargo, el desajuste entre la actividad de los osteoblastos y osteoclastos tiene implicaciones immuno patológicas asociadas a una disminución o aumento de la densidad mineral ósea. El factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) es producido por los osteoblastos durante las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas. La regulación de la osteoclastogénesis se basa en la existencia de 3 moléculas clave: osteoprotegerina (OPG), proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos, el receptor activador de NFkB ligando (RANK-L, ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos) y su receptor (RANK), receptor del anterior situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos), que pertenece a la familia del

factor de necrosis tumoral (TNF) (Fernández Tresguerres *et al.*, 2006; Mizoguchi *et al.*, 2009; Kohli, y Kohli, 2011). La interacción entre RANK-L y su receptor RANK conduce a la diferenciación y a la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción. Asimismo, los efectos del RANKL tanto *in vivo*, como *in vitro* son inhibidos por la OPG (Brecher *et al.*, 1978). Cuando se unen OPG y RANK-L se inhibe la unión de RANK-L a RANK y no hay diferenciación osteoclástica. Por ello OPG, RANK y RANK-L son importantes reguladores de la osteoclastogenesis (Fernández Tresguerres *et al.*, 2006).

Los cambios de la estructura ósea evolucionan en diferentes fases; en la primera fase o de reparación, la agresión del hueso trae como consecuencia una respuesta inflamatoria y a su vez una vasodilatación intensa con liberación de sustancias vaso activas que terminan desencadenando una osteítis rarefaciente. El mecanismo por el cual se puede alcanzar la osteítis rarefaciente se encuentra vinculada a la acción de los osteoclastos a través de un fenómeno de reabsorción de matriz ósea mineralizada llamado osteoclasia (Rodríguez, 2000; Lew, y Waldvogel 2004; Calhoun *et al.*, 2008).

En una segunda fase, la acción directa de agentes químicos o físicos se añade al compromiso vascular que aparece en la osteomielitis, donde la endoarteritis obliterante va a dar origen a los fenómenos trombóticos que comprometen la irrigación del hueso hasta producir la necrosis del mismo. El compromiso vascular se hace evidente, también durante la acción de agentes traumáticos que ocasionan rupturas vasculares o factores vasoconstrictores que al actuar sobre la vascularización terminal de la mandíbula favorecen zonas de isquemia y finalmente necrosis (Rodríguez, 2000; Lew y Waldvogel, 2004; Calhoun *et al.*, 2008). En añadidura existe la acción necrotizante de las toxinas bacterianas, sobre todo de microorganismos coagulasa positivo, y fenómenos oxidativos debido a la inflamación ósea y compresión de los canalículos óseos. Se produce durante esta fase una condensación esclerosa que rodea la zona rarefaciente y circunscribe el área de necrosis. Estos secuestros pueden ser de dimensiones variables según la causa de la osteomielitis, su localización y el área anatómica afectada (Rodríguez, 2000)

En la tercera fase de condensación, el organismo trata de restablecer el equilibrio alterado mediante la regeneración ósea a través de los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular produciendo una vasodilatación regional intensa o hiperemia. Estas respuestas favorecen la mineralización del tejido conectivo intraóseo que se ve

compensada en parte por la resorción que ocurre en el periostio liberando sales cálcicas. Este doble mecanismo reparador por parte del hueso y el periostio da origen a una osteítis condensante o también denominada involucro o cápsula secuestral que contiene el secuestro, a modo de neoformación ósea en forma de un grosero estuche perforado (Rodríguez, 2000; Fernández Tresguerres *et al*, 2006).

Los estreptococos orales y actinomicas con PMNs están mediados por ácido siálico y adhesinas lo que da como resultado la activación de los PMNs y por consiguiente contribuyen a la iniciación de la inflamación oral. Estos efectos son notables para la adhesión de *Streptococcus gordonii* y *Actinomyces naeslundii* a las glicoproteínas de superficie de PMNs identificadas como CD43 (150-kDa y 130-kDa) y CD45 (200 kDa). Ambas glicoproteínas poseen dominios extracelulares e intracelulares que están implicados en la transducción de la señal de activación de PMNs (Ruhl *et al.*, 2000).

Los componentes de la placa microbiana inducen la infiltración inicial de las células inflamatorias incluyendo linfocitos, macrófagos, PMNs y especialmente lipopolisacáridos, que juegan un rol importante al activar los macrófagos para sintetizar y secretar una amplia variedad de moléculas incluyendo interleukina-1 (IL-1), TNF α , prostaglandinas, especialmente PGE2 y enzimas hidrolíticas. Asimismo, las sustancias bacterianas activan los linfocitos T y producen IL-1 y linfoxina (LT), una molécula con propiedades muy similares a TNF α , de actividad proinflamatoria y catabólica desempeñando un papel clave en la descomposición del tejido periodontal (Page, 1991; Assuma *et al.*, 1998).

La cavidad bucal es puerta de entrada de numerosos microorganismos, pero protege su integridad mediante mecanismos inespecíficos y específicos, particularmente anticuerpos secretores de IgA. que previenen la adherencia de los microorganismos a la superficie de la mucosa y los dientes mediante la agregación facilitando la fagocitosis. Cuando estos mecanismos fallan, los microorganismos patogénicos inducen al infiltrado de PMNs y linfocitos T hacia la encía. En una osteomielitis grave, el infiltrado linfocitario se compone básicamente de linfocitos B y células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas de clase IgG, con la característica de carecer, casi absolutamente, de la subclase IgG2. Esto último puede ser debido a cierto grado de activación inespecífica de los linfocitos que fluyen hacia el área inflamada, debido

a la acción de mitógenos y proteasas de origen bacteriano. (Yamazaki *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2007)

Un modelo de osteomielitis experimental cuantitativa en ratones demostró que la osteólisis se manifiesta en una semana, con formación de secuestro e involucro, presencia de bacterias Gram-positivas y la formación de biopelículas en el hueso necrótico. Serológicamente en los ratones existió además una respuesta humoral de IgM que luego al día 11 se convierte en una respuesta específica IgG2b contra proteínas del gen nuc de *Staphylococcus aureus* cuyo pico de carga bacteriana ocurre precisamente el día 11 (Li *et al.*, 2008).

El compromiso de suministro de sangre local es el factor crítico en el establecimiento de la osteomielitis aguda, crónica y secundaria. Una vez iniciada la enfermedad ya sea vía hematógena o causado por una extensión local de una infección vecina, el proceso continúa con la invasión bacteriana profunda de la médula y corteza del hueso. En personas el curso clínico de la osteomielitis aguda puede ser agudo supurativo, subagudo supurativo y asintomático con o sin supuración. El curso clínico supurativo agudo muestra signos impresionantes de inflamación y mucho dolor profundo del hueso; la ubicación del maxilar inferior próximo a una cavidad oral muy contaminada la hace vulnerable a la infección secundaria causada por una condición patológica que altera la fisiología o la vascularización (Baltensperger y Eyrych, 2009; Calhoun *et al.*, 2009; Mustafá *et al.*, 2014)

El cuadro morfológico de la osteomielitis crónica primaria se rige por reacciones mesenquimales de la médula ósea, por el infiltrado inflamatorio y alteraciones secundarias óseas como la osteólisis; el infiltrado inflamatorio se compone de células plasmáticas que pueden incluso ser predominantes. Los granulocitos forman una proporción variable, en su mayoría menor. También están presentes los linfocitos y los macrófagos. El edema de los espacios de la médula ósea puede ser un hallazgo prominente. Aunque no se ha encontrado el tipo de respuesta inflamatoria para predecir confiablemente el curso clínico de la enfermedad, sin embargo puede proporcionar una pista importante hacia la actividad de la enfermedad; la formación de micro abscesos neutrofílicos en la osteomielitis crónica esclerosante difusa de la osteomielitis crónica primaria son interpretados como señales de la fase activa de la enfermedad y

correlacionaron bien como mezclas osteolíticas y osteoescleróticas lo cual es mencionado por Li *et al.*, (2008) y Baltensperger y Eyrich (2009).

2.5 Signos clínicos

En alpacas la primera evidencia de la enfermedad es el abultamiento de la zona mandibular afectada, que en sus inicios solo es detectable a la palpación (Moro y Guerrero, 1971), posteriormente la inflamación es notable a simple vista, son duras, inmóviles y en etapas tardías son dolorosas al tacto, con frecuencia se abren en la piel a través de uno o varios orificios permitiendo la salida de pus de aspecto purulento que posee gránulos diminutos y duros de color blanco amarillento el maxilar inferior sufre una rarefacción ósea formándose cavidades conectadas por fístulas que se encuentran ocupadas por material purulento debido a la contaminación de bacterias piógenas que finalmente drenan al interior y exterior de la boca. Los dientes enclavados en el hueso enfermo pierden su alineación y presentan dolor, dificultando la masticación con pérdida subsiguiente del estado general. Esta enfermedad es un proceso inflamatorio de naturaleza infecciosa que afecta a la médula ósea y al hueso cortical. Cursa con progresiva destrucción inflamatoria con formación de pus que daña el flujo vascular óseo, y puede evolucionar a la cronicidad. Es común que exista dolor local y drenaje purulento en la zona con pérdida de tejido óseo y secuestros (Cuba, 1949; Moro 1956, Pezo *et al.*, 1996).

Alpacas con abscesos dentales suelen presentar hinchazón causada por una infección y el grado de inflamación es generalmente indicativo de la cronicidad de la enfermedad. Por ejemplo una fístula purulenta suele estar presente en las últimas etapas de la enfermedad. La mayoría de los animales pueden comer y no aparentan dolor al masticar. El dolor generalmente se produce a la palpación externa de la hinchazón, pero el dolor a la masticación y anorexia posterior no suele ser un signo clínico temprano, y más bien pueden estar presentes en etapas muy tardías de la enfermedad. Además, los animales con abscesos dentales maxilares pueden presentar desviación mandibular, secreción nasal maloliente si está implicado el seno maxilar. (Niehaus, 2009)

El actinomicosis del maxilar en vacunos comienza por una tumefacción ósea indolora localizada en uno o ambos maxilares, casi siempre a nivel molar central; las infecciones precoces se pueden confundir con lesiones traumáticas. El agrandamiento inflamatorio

puede ser discreto y, como radica en la mandíbula, aparece como engrosamiento del borde inferior del hueso con la mayor parte de su volumen en el espacio inter mandibular. Estas lesiones a menudo no se descubren sino hasta que adquieren gran extensión, cuando ya el tratamiento es ineficaz. Las lesiones discretas más comunes se observan con más facilidad en las superficies laterales de los huesos. En algunas lesiones el aumento del volumen es rápido, pues se produce en pocas semanas, mientras que en otros casos se requieren meses. En casos graves, la diseminación hacia los tejidos blandos puede ser extensa y llegar a los músculos y aponeurosis de la región faríngea; la inflamación excesiva de los mandibulares eventualmente puede producir disnea, y llevando al paciente a tal estado de agotamiento que se impone el sacrificio, aunque para llegar a esta etapa deben transcurrir siempre varios meses (Gasque, 2008).

Las manifestaciones clínicas de la osteomielitis pueden ser muy variables y dependen del tipo de hueso afectado, agente causal y del tiempo de evolución. En las osteomielitis hematógenas de los niños es frecuente la fiebre con escalofríos, irritabilidad, letargo y malestar general con dolor eritema, calor e inflamación de la región afectada, limitaciones de la extremidad involucrada y pérdida de peso; Las manifestaciones sistemáticas se ven en 50 % o menos de los pacientes afectados. En adultos tiene en general una evolución crónica y presenta síntomas en los que predomina el dolor local con o sin fiebre. En las osteomielitis por contigüidad, la sintomatología suele tener un comienzo agudo en el primer mes con escalofríos, sudores nocturnos, fiebre, dolor, eritema, hinchazón y supuración de pus alrededor de la fístula e inflamación de tejidos blandos adyacentes y desviación mandibular. (Marín *et al.*, 2010). En adultos con osteomielitis hematógena primaria o recurrente se presentan signos de dolor inespecífico y fiebre de uno a tres meses de duración (Baltensperger y Eyrich, 2009). Ambas osteomielitis foco contiguo y hematógena puede progresar a una enfermedad crónica, con pérdida de masa ósea local, formación de sequestro y esclerosis. Normalmente se eleva la tasa de sedimentación eritrocítica, reflejando la inflamación crónica, pero el recuento de leucocitos de la sangre es generalmente normal. El diagnóstico de la osteomielitis del hueso largo se basa en el aislamiento del patógeno de sangre o de la lesión ósea (Calhoun *et al.*, 2009)

2.6 Tratamiento

En alpacas y llamas el tratamiento acertado puede lograrse con cualquier tratamiento médico, intervención quirúrgica, o una combinación de terapia médica que consta de antiinflamatorios y antibióticos sistémicos o ambos, estos abscesos óseos son algo aislados de la circulación sistémica y la terapia a largo plazo es generalmente necesaria. En estados crónicos de la enfermedad que no responden a la terapia médica se requiere cirugía para extirpar el nido de la infección (raíz del diente y diente) o los animales son destinados al camal. El tratamiento médico ha demostrado ser exitoso utilizando una dosis subcutánea de 20 mg/kg de florfenicol cada día durante diez días con relativo éxito. Aparentemente funciona mejor que el protocolo médico previo de 30 días de penicilina procainica G y la mayoría de los animales no requieren cirugía. (Fowler, 1995; Niehaus, 2009)

Es recomendable el sacrificio de los animales atacados con osteomielitis mientras no se describa un método efectivo de control. Para detener el proceso, se puede aplicar topicalmente en la ulceración cutánea con ungüento a base de subnitrito de bismuto, yodoformo y vaselina líquida y en la mucosa bucal medicamentos a base de azul de metileno (Moro, 1956), se menciona que es posible tratar administrando antibacterianos a base de penicilina y tetraciclinas entre otros por vía parenteral (Ramírez *et al.*, 1998).

En vacunos, las lesiones locales se tratan con solución de lugol y, en ocasiones, se administra yoduro de sodio por vía intravenosa para las lesiones internas. Se recomienda aunar antibiótico al tratamiento como: penicilina, estreptomicina (11 mg/kg tres veces al día por 5 días) aureomicina y, a veces, dan resultado las tetraciclinas. El antibiótico se inyecta en la periferia de las lesiones durante 5 días consecutivos. Sin embargo, a pesar de lo anterior no resulta del todo efectivo; si el tamaño de la lesión es muy grande, el tratamiento resulta ineficaz (Gasque, 2008)

El objetivo de la terapia para la osteomielitis es erradicar la infección y restaurar la función. Sin embargo, la mayoría de casos de osteomielitis en adultos requieren una combinación de terapia médica y quirúrgica. El éxito del tratamiento depende de la selección y administración del antibiótico adecuado, y la intervención quirúrgica cuando esté indicado. (Calhoun *et al.*, 2008). La duración de la terapia antibiótica depende en gran medida de la severidad de la infección, de la respuesta clínica al tratamiento y de la normalización de las pruebas de laboratorio. La evidencia sugiere que tratamientos con

duración menor a tres semanas se asocian con mayores tasas de recaída o recurrencia. En algunos casos puede incluso ser mayor a 4 semanas si ha habido retraso, si el drenaje quirúrgico de la pus ha sido incompleta, también si existen múltiples focos, como en la enfermedad estafilocócica diseminada. Los esquemas terapéuticos se pueden modificar de acuerdo a la respuesta clínica, a la bacteria aislada y a su sensibilidad antimicrobiana, en donde la terapia específica se basa en la sensibilidad en vitro de los organismos aislados del hueso o de la sangre. Por ejemplo, en la osteomielitis aguda por *Staphylococcus aureus*, el tratamiento debe ser dirigido a erradicarlo mediante las penicilinas (oxacilina, cloxacilina, nafcilina), clindamicina, cefalosporinas de primera generación y la vancomicina (Mónchez, 2013).

La clindamicina puede ser efectiva contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes adquiridos en la comunidad (SAMR-AC), pero debe excluirse la resistencia inducible a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLSB). Si hay resistencia a MLSB la vancomicina es el agente de elección y según estudios es el antibiótico “Gold Standard” para el tratamiento de la osteomielitis aguda por SAMR-AC. También para tratar infecciones graves se utilizan la gentamicina y la rifampicina que actúan con sinergia. El linezolid debe considerarse en infecciones graves que no responda adecuadamente a la vancomicina. Los principales factores que se han relacionado con estas complicaciones son: el retraso en el diagnóstico e implementación del tratamiento, o bien tratamientos inadecuados. Se han reportado complicaciones severas asociadas a infecciones por cepas de *Staphylococcus aureus* SAMR-AC que poseen factores de virulencia asociados a un mal pronóstico (Romero., *et al*; 2008; Garg, 2013; Monchez, 2013).

Linezolid es la primera droga aprobada en la clase nueva de antimicrobiales oxazolidinone. Tiene actividad en contra de *Estafilococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococci*, pero es resistente a vancomicina. Linezolid tiene excelente biodisponibilidad cuándo es administrado oralmente. Sin embargo, el prolongado uso de linezolid ha sido asociado con pancitopenia, neuropatía periférica, y neuritis óptica. Se ha demostrado que la combinación de la linezolid más rifampicina o vancomicina es eficaz en un modelo experimental de osteomielitis crónica en ratas con cuerpo extraño contra cepas de MRSA y que el tratamiento combinado se asoció con dosis menores de aparición de resistencia a rifampicina, y no se demostró la resistencia a la vancomicina o linezolid (Vergidis *et al.*, 2011).

La daptomicina es un lipopeptido cíclico recientemente aprobado contra germen Gram positivos, incluyendo MRSA y vancomicina-resistentes enterococcus (VRE). Fue utilizado en 220 pacientes con infecciones en la rodilla (22 %) y cadera (21 %) por *Staphylococcus Aureus* (33 %) y estafilococos coagulasa negativos (32 %). El éxito clínico fue logrado en 75 % de pacientes, sugiriendo que el daptomycin sea una opción efectiva de tratamiento de osteomielitis. (Seaton *et al.*, 2013)

En los casos de osteomielitis se aconseja su empleo en las formas subagudas o de localizaciones atípicas que requieren prolongada terapia oral. (Lazzarini *et al.*, 2005). En osteomielitis pediátrica, la terapia oral con cloxacilina fue más efectiva que la tetraciclina. Además, la clindamicina oral fue tan eficaz como las penicilinas antiestafilocócicas aplicadas vía parenteral. En otros tratamientos las fluoroquinolonas orales fueron tan efectivas como los tratamientos parenterales estándar. Aunque la duración óptima de la terapia antibiótica sigue siendo indefinida, la mayoría de los investigadores trataron a los pacientes durante unas seis semanas. La elección del antibiótico debe también basarse en la seguridad de actuar contra varios agentes para uso prolongado y en el costo y la practicidad del régimen elegido. Se necesitan estudios adicionales, bien diseñados, para determinar el agente, ruta y duración del tratamiento con antibióticos en pacientes con osteomielitis (Lazzarini., *et al* 2005)

III MATERIAL Y METODOS

3.1 Lugar de ejecución.

El procesamiento de los casos clínicos y análisis de las muestras del presente estudio se realizó en la Estación Experimental Marangani del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), ubicado en el distrito de Marangani, provincia de Canchis, región Cusco, a una altitud de 4,635 msnm, en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección de Bacteriología y en el Laboratorio de Histología,

Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2 Animales.

Las muestras se obtuvieron entre los años 2012 al 2014, se seleccionaron 30 alpacas huacaya con procesos de osteomielitis clínica, de las cuales 21 eran adultas, 6 tuis y 3 crías sin distinción de sexo del Centro Experimental la Raya UNSAAC Cusco (21 adultas y 3 crías = 24), y de la Estación IVITA Marangani de la FMV (tuis = 6).

3.3 Materiales

Material de fijación y coloración histopatológica:

- Formalina tamponada neutra al 15 %
- Alcohol etílico al 100 %
- Alcohol etílico al 95 %
- Alcohol etílico al 75 %
- Xilol
- Coloración de Hematoxilina Eosina (HE)
- Ácido nítrico 1%

Medios de Cultivo:

- Agar tripticasa soya (DIFCO) + 10% de sangre desfibrinada de ovino
- Caldo tioglicolato (DIFCO)
- Agar Mc Conkey (DIFCO)
- Medio de transporte Cary & Blair (DIFCO)

Medios para diferenciación bioquímica:

- Citrato de Simmons
- TSI, SIM, LIA
- Medios de carbohidratos
- Prueba de oxidasa
- Reactivos:
- Batería de coloración de Gram
- Aceite de inmersión
- Reactivo de Kovac

- Rojo de metilo

Material de vidrio:

Placas petri, matraz, beaker, laminas porta y cubre objetos, pipetas, tubos de ensayo, campana de anaerobiosis, probetas, embudos y frascos graduados

Material de cirugía

Tijeras, pinzas, espátula, mango y bisturí, bandejas, guantes, bolsas estériles

Otros:

Frascos con desinfectante, ansas de siembra, gradillas, mechero Bunsen, goteros, papel lente, papel toalla, jeringas de 20cc con agujas de 18 x 1 1/2, gas pack, refrigerantes, e hisopos estériles

3.4 Metodología.

3.4.1 Estudios clínicos.

El examen clínico fue realizado visualmente evaluando el estado corporal general, predisposición para ingerir alimentos y presencia de alteraciones en la región mandibular. Posteriormente, los animales fueron palpados buscando alteraciones tales como engrosamientos, tumoraciones y formaciones fistulosas. Las lesiones fueron descritas según los diferentes grados de afección en cada una de las regiones anatómicas descritas por Sato y Angulo (2015) (Figura 1).

3.4.2 Estudios patológicos.

3.4.2. 1. Estudios patológicos macroscópicos.

Los animales con osteomielitis fueron sacrificados bajo las normas del Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria. La necropsia se realizó mediante inspección y palpación para determinar las alteraciones patológicas macroscópicas del maxilar inferior. Las lesiones fueron descritas siguiendo y precisando alteraciones anatómicas de acuerdo a lo reportado por Sato y Angulo (2015) (Fig. 1).

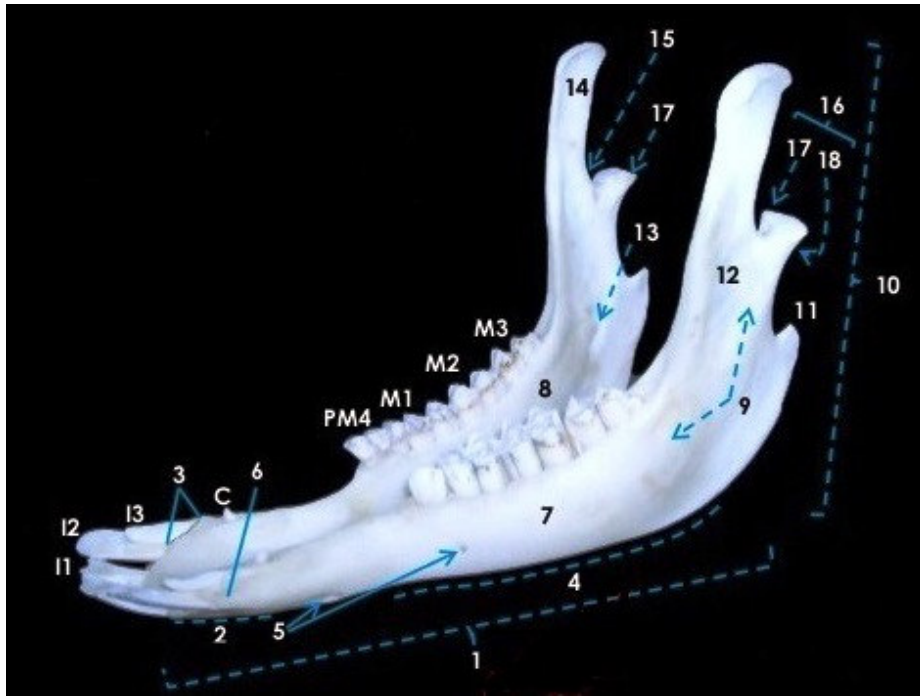


Figura 1 Mandíbula vista rostrolateral izquierda. Fuente Sato y Angulo (2015)

- | | |
|--------------------------|-------------------------------|
| 1. Cuerpo mandibular | 14. Proceso coronoides |
| 2. Parte incisiva | 15. Incisura mandibular |
| 3. Arco alveolar | 16. Proceso condilar |
| 4. Parte molar | 17. Cabeza mandibular |
| 5. Agujeros mentales | 18. Cuello mandibular |
| 6. Cara labial | M3. Molar tercero inferior |
| 7. Cara bucal | M2. Molar segundo inferior |
| 8. Cara lingual | M1. Molar primero inferior |
| 9. Angulo mandibular | PM4. Premolar cuarto inferior |
| 10. Rama de la mandíbula | C. Canino inferior |
| 11. Proceso angular | I3. Incisivo tercero inferior |
| 12. Fosa mesentérica | I2. Incisivo segundo inferior |
| 13. Agujero mandibular | I1. Incisivo primero inferior |

3.4.2.2. Estudios histopatológicos.

Para la descripción histopatológica del tejido óseo de animales afectados, las muestras fueron fijadas en formol al 15 % y la descalcificación ósea se realizó con ácido nítrico 1%. La reducción, deshidratación, inclusión en parafina y coloración de hematoxilina eosina se realizaron mediante las técnicas descritas por (Humanson (1967).

3.4.3 Estudios microbiológicos.

Después de la preparación aséptica del tejido afectado, se utilizó una jeringa descartable de 10 ml con aguja estéril calibre 18 x 1 ½” introduciéndola en el punto medio de la fístula para facilitar el drenaje adecuado y coleccionar por aspirados para el análisis bacteriológicos. Los aspirados se trasladaron en frascos bijoux conteniendo medio de transporte de Cary y Blair (Difco) y enviadas al laboratorio en recipientes de espuma de poliestireno con hielo para luego ser sembradas en placas petri con medios de cultivos, agar tripticosa soya agar (TSA) + 10% de sangre de ovino desfibrinada (agar sangre), tioglicolato y medio selectivos MacConkey. Posteriormente, las placas petri fueron incubadas a 37° C de 24 a 72 horas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Se realizó el aislamiento para obtener colonias específicas para el reconocimiento morfológico y la identificación bacteriana mediante la técnica de coloración Gram. Luego se realizó el trasplante en medios diferenciales bioquímicos como SIM para ver movilidad y presencia de residuos de H₂S e indol. En caldo úrea para ver la presencia de ureasa. En Agar Simmons Citrato para determinar la capacidad de utilizar el citrato como fuente de carbono. En medio TSI para determinar la fermentación de carbohidratos (Glucosa, lactosa, sacarosa). En Agar Lisina para medir la capacidad de las bacterias de usar al aminoácido lisina como fuente de carbono. Las colonias fueron procesadas, identificadas y tipificadas de acuerdo a las técnicas descritas por Krieg, y Holt, (1984).

3.4.4 Análisis de la información:

El análisis microbiológico de datos se determinó mediante frecuencias y porcentajes de agentes. El análisis de los estudios clínicos y estudios patológicos fueron de tipo descriptivo de acuerdo a la presentación de las lesiones en el maxilar inferior en la rama horizontal, espacio intermandibular y sínfisis mandibular.

Las alteraciones histopatológicas fueron clasificadas como trastornos inflamatorios según Thomson (1978). El grado de severidad fue descrito según Slauson y Cooper (2002) y según la modificación del laboratorio de Embriología Histología y Patología de la FMV, estas lesiones fueron clasificadas de acuerdo a su extensión:

Grado Severidad

- 0 Ausencia de lesiones
- I Escasa, presencia de la lesión hasta 25% de superficie del corte
- II Leve, presencia de lesión del 25% hasta 50% de superficie del corte
- III Moderada, presencia de lesión del 50% hasta 75% de superficie del corte
- IV Grave, presencia de lesión del 75% hasta 100% de superficie del corte

La frecuencia de ocurrencia de lesiones anátomo patológicas fueron analizadas mediante la fórmula:

$$\text{Frecuencia} = \frac{\text{Nro. de animales con "X" lesión}}{\text{Nro. total de muestras}} \times 100$$

X = Alteraciones clínicas

N = Tamaño Muestral.

IV RESULTADOS

Se realizaron los estudios clínicos, patológicos macroscópicos e histopatológicos y la descripción de los agentes microbiológicos en 30 alpacas clínicamente diagnosticadas con osteomielitis del maxilar inferior, de las cuales 21 eran adultas, 6 tuis y 3 crías.

4.1 ESTUDIOS CLINICOS

4.1.1 Observaciones clínicas de osteomielitis en 21 alpacas adultas.

Al examen clínico de 21 alpacas adultas se observaron lesiones de grado leve ($n=3$), moderado ($n=10$) y grave ($n=8$). Las lesiones leves fueron focalizadas y observadas en tres alpacas que mostraron buenas condiciones corporales (Cuadro 1). Dos alpacas de este grupo presentaron engrosamiento de la cara bucal de la parte molar izquierdo y en la tercera alpaca se observó engrosamiento en la cara labial del espacio edéntulo que se extendía hasta la parte incisiva (Figura 2).

Las 10 alpacas con osteomielitis moderada tenían una regular condición corporal y lesiones consistentes en engrosamientos y tumoraciones con secreciones purulentas adheridas a la fibra de la zona submandibular en donde se observó la presencia de una fístula. (Figuras 3 y 4). En algunos de estos animales ($n=3$) fue posible detectar la abertura interna de la fístula en la cavidad bucal que comunica con la lesión ósea en donde se halló pasto y restos del bolo alimenticio y secreciones purulentas que finalmente drenaban al exterior. Siete de estos 10 animales presentaron abultamientos y tumoraciones multifocales en la cara labial y lingual del cuerpo mandibular izquierdo. En dos alpacas se palparon engrosamientos y tumoraciones en el espacio edéntulo y en uno de ellos la lesión continuaba hasta la parte incisiva. En un animal el engrosamiento continuaba hasta el espacio edéntulo derecho, donde las lesiones eran más leves. Una alpaca solo presentó engrosamiento y tumoración en la parte incisiva (Cuadro 1).

Las ocho alpacas que mostraron lesiones de osteomielitis grave en presentaban una evidente pérdida de peso y dificultad para alimentarse y caminar. En cinco casos, las lesiones fueron avanzadas con una ligera desviación del maxilar al lado opuesto de la lesión (Figura 5). En este grupo fue frecuente observar secreciones purulentas adheridas a la fibra, engrosamientos y tumoraciones a nivel submandibular, las cuales a la palpación abarcaban el cuerpo mandibular izquierdo, el espacio edéntulo en sus caras labial y lingual, parte incisiva continuando al espacio edéntulo, y finalmente el cuerpo mandibular

derecho. Estas lesiones fueron más severas y frecuentes en el maxilar izquierdo que en el derecho (Figuras 6, 7 y 8; cuadro 1). Además en 30 alpacas se observaron fístulas en el interior de la boca con abundante material purulento y pequeños pedazos de secuestros entremezclados con pasto las cuales drenaban el exterior (Figura 7).

Cuadro 1. Número de lesiones según localización, tipo y grado en 21 alpacas adultas con osteomielitis de la parte molar, espacio edéntulo y parte incisiva de las caras bucal y lingual del cuerpo mandibular izquierdo y derecho.

Localización	Tipo de lesión			Grado de lesión			n*
	Engrosamiento	Tumoración	Fístula	Leve	Moderado	Grave	
Cuerpo mandibular izquierdo cara bucal	14	11	12	2	20	15	37
Cuerpo mandibular izquierdo cara lingual	8	8	-	-	8	8	16
Espacio edéntulo izquierdo cara bucal	11	9	10	1	7	24	30
Espacio edéntulo izquierdo cara lingual	7	7	-	-		14	14
Parte incisiva	12	11	6	1	7	21	29
Cuerpo mandibular derecho cara bucal	8	3	-	-	2	9	11
Cuerpo mandibular derecho cara lingual	5	2	-	-	2	5	7
Espacio edéntulo derecho cara bucal	9	8	6	-	3	20	23
Espacio edéntulo derecho cara lingual	7	3	-	-	1	9	10
Total de lesiones	81	62	34	4	50	125	177

n= número de lesiones



Fig. 2 Lesión de grado leve en la parte incisiva de una alpaca adulta (Flecha)



Fig. 3 Fístula y engrosamiento moderado de alpaca adulta.



Fig. 4 Lesión fistulada moderada submandibular de animal adulto.



Figura 5. Desviación del maxilar inferior.



Fig. 6 Fístula purulenta grave submandibular



Fig. 7 Secuestros en fístula submandibular

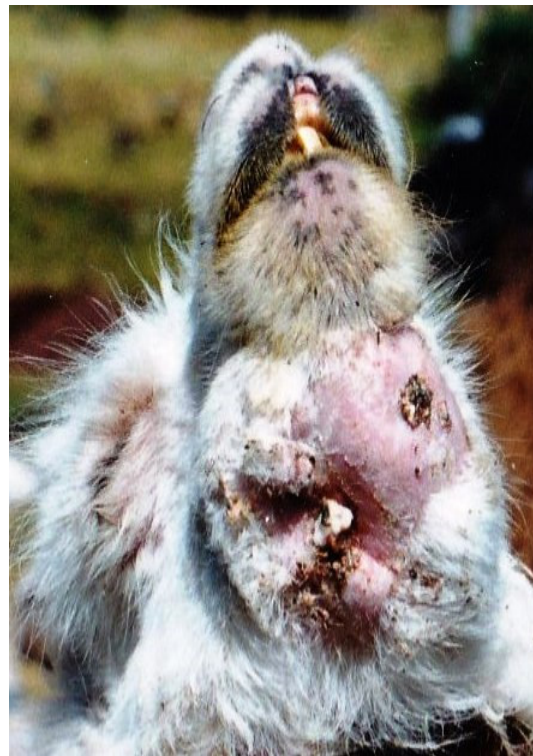


Fig. 8 Fístulas, engrosamiento y tumoraciones graves submandibulares.

4.1.2. Observaciones clínicas de osteomielitis en seis alpacas tuis.

Al examen clínico de cuatro alpacas tuis de buenas condiciones corporales, se observaron lesiones por osteomielitis leve. Se palparon engrosamientos focalizados en la parte molar de la cara bucal del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo y en otra alpaca en la parte molar del maxilar inferior derecho; otras dos alpacas presentaron engrosamiento y tumoraciones en la cara lingual de la parte molar del maxilar inferior izquierdo (Cuadro 2).

Se observaron lesiones moderadas en dos alpacas tuis de bajo peso vivo y condición corporal regular, que presentaban secreciones purulentas adheridas a la fibra de la zona submandibular. A la palpación se apreció un marcado engrosamiento y tumoración en la cara lingual la parte molar del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo (Figura 9). Además se observó la presencia de fístulas a nivel submandibular en la parte molar del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo y en la parte incisiva. Las fístulas comunicaban desde el interior de la boca con el hueso maxilar, y a su vez con el exterior drenando pus (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de lesiones según localización, tipo y grado en 6 alpacas tuis con osteomielitis del maxilar inferior de la parte molar, espacio edéntulo y parte incisiva de las caras bucal y lingual del cuerpo mandibular izquierdo y derecho.

Localización	Tipo			Grado			n*
	Engrosamiento	Tumoración	Fístula	Leve	Moderado	Grave	
Parte molar izquierdo cara bucal	3	1	1	1	1	2	9
Parte molar izquierdo cara lingual	3	3	-	4	2	-	12
Espacio edéntulo izquierdo cara bucal	-	-	-	-	-	-	0
Espacio edéntulo izquierdo cara lingual	-	-	-	-	-	-	0
Parte incisiva	1	1	1		3	-	6
Parte molar derecho cara bucal	3	2	-	1	-	4	10
Total de lesiones	10	7	2	6	6	6	37

n= número de lesiones



Fig. 9. Fístula submandibular, engrosamiento y necrosis del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo en una alpaca tui.

4.1.3. Observaciones clínicas de osteomielitis grave en crías de alpacas.

Se observaron signos de osteomielitis grave en tres crías de alpacas entre 20 y 45 días de edad con escaso desarrollo y que mostraban decaimiento y depresión. Las crías presentaron fístulas internas entre la base de los premolares y molares con material purulento entremezclado con pasto. En dos animales se observó a la palpación engrosamiento y tumoración en la parte molar del cuerpo mandibular del maxilar inferior derecho (Figura 10) y en otro animal en la parte molar del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo. Estas crías murieron durante el desarrollo de la enfermedad.



Figura 10. Cría con engrosamiento y tumoración del cuerpo mandibular del maxilar inferior derecho.

4.2. Estudios patológicos

4.2.1. Observaciones macroscópicas.

Se observaron a la necropsia 21 alpacas adultas, seis tuis y tres crías. Las lesiones macroscópicas estaban ubicadas en la parte molar del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo y derecho, espacios edéntulos en sus caras bucal y lingual y en la parte incisiva. La frecuencia de lesiones por presencia de trayectos fistulosos purulentos, hiperostosis, rarefacción, necrosis e involucro con secuestro, fueron diagnosticados visualmente y por palpación.

4.2.1.1. Observación de lesiones macroscópicas en 21 alpacas adultas

Tres alpacas adultas presentaban lesiones agudas iniciales caracterizadas por prominencias hiperostósicas en la base de los dientes premolar y molar (Cuadro 3). Un animal evidenció lesiones en las caras bucal y lingual del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo (Figura 11). Un segundo animal desarrolló hiperostosis solo en la cara bucal del maxilar inferior izquierdo. El tercer animal mostró únicamente una hiperostosis extendida desde del espacio edéntulo izquierdo hasta la parte incisiva.

Diez alpacas adultas presentaron lesiones crónicas caracterizadas por tumoraciones con prominencia en la región submandibular, en la base de los dientes pre molar y molar. En

todos los casos se observaron amplias cavidades con exudado purulento cremoso verdoso, pasto y desechos que se alternan con rarefacción del tejido óseo, el proceso inflamatorio que afecta al hueso se extiende a las partes blandas mediante trayectos fistulosos purulentos que se abren a la piel (Figura 12). En siete de estos animales se observó hiperostosis, rarefacción y necrosis en la cara bucal y lingual de la parte molar del maxilar inferior izquierdo (Figura 13). Dos alpacas presentaban hiperostosis, rarefacción y necrosis en el espacio edéntulo; en una de ellas las lesiones continuaban hasta la parte incisiva y en el otro animal las lesiones continuaban hasta el espacio edéntulo derecho, donde la hiperostosis era menos evidente. En una última alpaca se encontró hiperostosis solo en la parte incisiva (Cuadro 3).

Ocho alpacas adultas evidenciaban un proceso inflamatorio crónico continuo que afectó la cara bucal y lingual de la parte molar del cuerpo mandibular de los maxilares izquierdo y derecho, edéntulo y parte incisiva. Estas lesiones fueron más graves y frecuentes en el cuerpo mandibular de maxilar izquierdo que en el derecho (Cuadro 5). Las lesiones se extendieron a las partes blandas formando trayectos fistulosos purulentos que se abrieron en la piel (Figura 14). En el interior de la boca, los trayectos fistulosos comunicaban la cavidad bucal con la lesión ósea la cual contenía material purulento entremezclado con pasto. Además de las lesiones de hiperostosis, rarefacción y necrosis se pudo observar involucro con secuestros, disolución ósea y fractura del maxilar inferior, los alvéolos dentarios presentaron obliteración total o parcial, con presencia de tejido óseo de aspecto osteolítico, pérdida de la estructura de las paredes interalveolares, e inflamación con pérdida de las paredes de los alvéolos dentarios (Figuras 15 y 16)



Fig. 11. Hiperostosis en la cara lingual y labial del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo de una alpaca adulta.

Cuadro 3. Lesiones macroscópicas de alpacas adultas con osteomielitis del maxilar inferior de la parte molar, espacio edéntulo y parte incisiva de las caras bucal y lingual del cuerpo mandibular izquierdo y derecho.

LOCALIZACION	Tipo de lesión					Grado de lesión			n*
	Fístula	Hiper-ostosis	Rare-facción	necrosis	Involucro/ secuestro	Agudo	Crónico	Crónico continuo	
Parte molar izquierdo cara Bucal	12	14	10	10	5	2	24	25	51
Parte molar izquierdo cara Lingual	4	9	8	8	-	1	12	16	29
Espacio edéntulo izquierdo cara Bucal	10	11	9	7	6	1	8	34	43
Espacio edéntulo izquierdo cara lingual	-	6	6	6	5	-	-	23	23
Parte incisiva	6	12	10	6	4	1	8	29	38
Parte molar derecho cara bucal	2	8	3	3	2	-	2	16	18
Parte molar derecho cara lingual	-	5	2	2	2	-	2	9	11
Espacio edéntulo derecho cara Bucal	6	9	7	5	4	-	3	28	31
Espacio edéntulo derecho cara Lingual	4	5	2	2	2	-	1	14	15
Total	44	79	57	49	30	5	60	194	259

n= número de lesiones

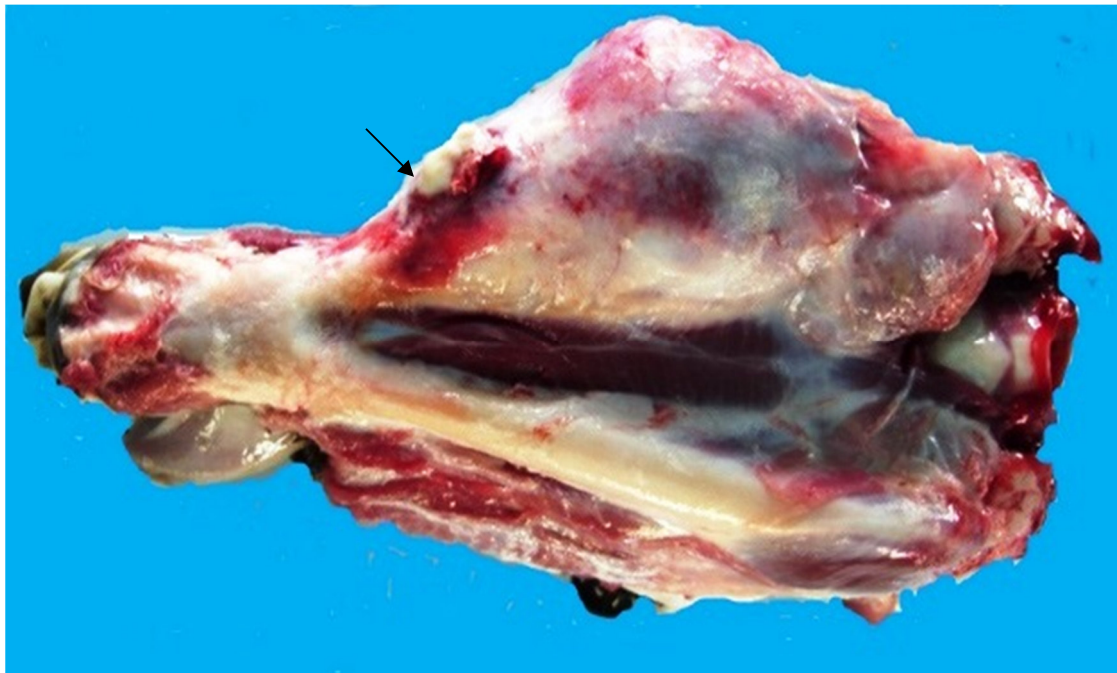


Fig. 12. Lesión crónica con trayecto fistuloso purulento (flecha) e hiperostosis del maxilar izquierdo en una alpaca adulta



Fig. 13. Lesión crónica en alpaca adulta, hiperostosis, rarefacción y necrosis en la cara bucal y lingual del maxilar izquierdo

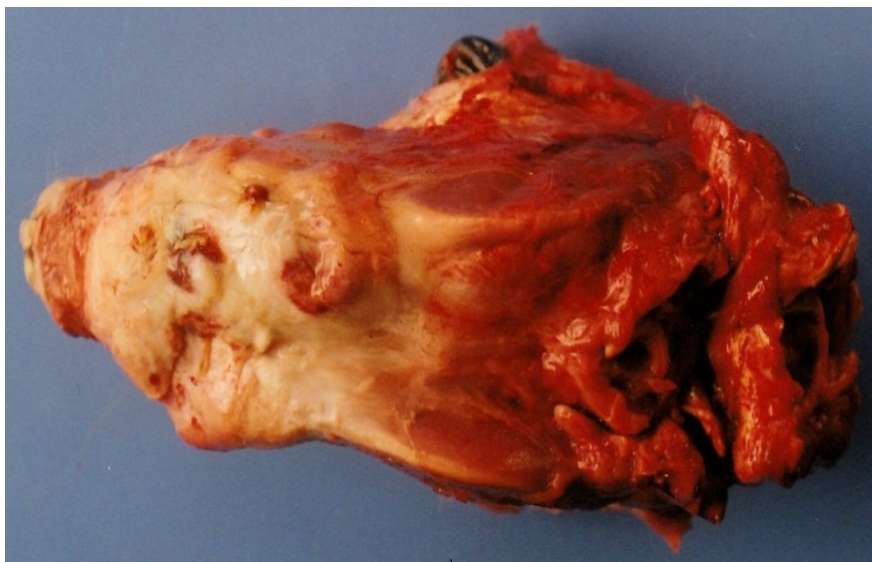


Fig. 14. Lesión crónica continuúa en una alpaca adulta: trayectos fistulosos purulentos que se abren en la piel.



Fig. 15. Hiperostosis y rarefacción ósea del maxilar inferior izquierdo de una alpaca adulta.



Fig. 16. Necrosis, secuestros, disolución ósea y fractura del maxilar inferior de una alpaca adulta.

4.2.1.2. Observación de lesiones macroscópicas en seis alpacas tuis

A la necropsia de seis alpacas tuis se halló que todas presentaban hiperostosis aguda focalizada sin afectar la base de los dientes molares. Tres de estos animales mostraron hiperostosis del maxilar inferior izquierdo en la cara bucal (1 tui) y lingual (2 tuis), respectivamente. En otros dos tuis la hiperostosis incluyó rarefacción de la cara lingual del maxilar izquierdo. Solo un tui evidenció hiperostosis en el maxilar derecho en la cara bucal. En dos alpacas tuis se observaron formaciones fistulosas purulentas a nivel submandibular en el cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo y en la sínfisis mandibular. Las fístulas comunicaban desde la cavidad bucal hasta el hueso y contenían material purulento entremezclado con pasto que drenaban al exterior. Además, en uno de estos tuis se halló hiperostosis, rarefacción y necrosis en la cara lingual del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo. Otro tui también presentó hiperostosis, rarefacción y necrosis en la sínfisis mandibular (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de lesiones macroscópicas de alpacas tuis con osteomielitis de la parte molar del cuerpo mandibular caras bucal y lingual del maxilar inferior izquierdo y derecho y parte incisiva.

Localización	Tipo de lesión				Grado de lesión		n*
	Fístula	Hiper- ostosis	Rare- facción	necrosis	Agudo	Crónico	
Parte molar izquierdo cara bucal	1	1	-	-	1	1	2
Parte molar izquierdo cara lingual	-	3	3	1	4	3	7
Parte incisiva	1	1	1	1	-	4	4
Parte molar derecho cara bucal	-	1		-	1	-	1
Total	2	6	4	2	6	8	14

n= número de lesiones

4.2.1.3. Observaciones de lesiones macroscópicas en tres crías

A la necropsia, en dos crías de alpacas se observaron lesiones de hiperostosis del maxilar inferior derecho con prominencia en la región submandibular y en la otra cría en el maxilar inferior izquierdo (Figura 17). Las lesiones ocurrían con rarefacción, necrosis e

involucro con secuestro, alternadas con áreas de neoformación de tejido óseo lo cual aumentaba notablemente el grosor de la parte molar de los cuerpos mandibulares del maxilar izquierdo y derecho (Figura 18). En una cría las piezas dentales estaban rechazadas hacia arriba y dejaban descubierta la porción basal de las raíces dentarias en donde se observaron amplias cavidades (involucro) que contenían secuestró óseos llenos de exudado purulento (Figura 19). La osteomielitis crónica se extendió a las partes blandas a través de formaciones fistulosas purulentas desde la cavidad bucal hasta la lesión ósea observándose entre la base de los premolares y molares material purulento entremezclado con pasto.



Fig.17. Hiperostosis submandibular cría.

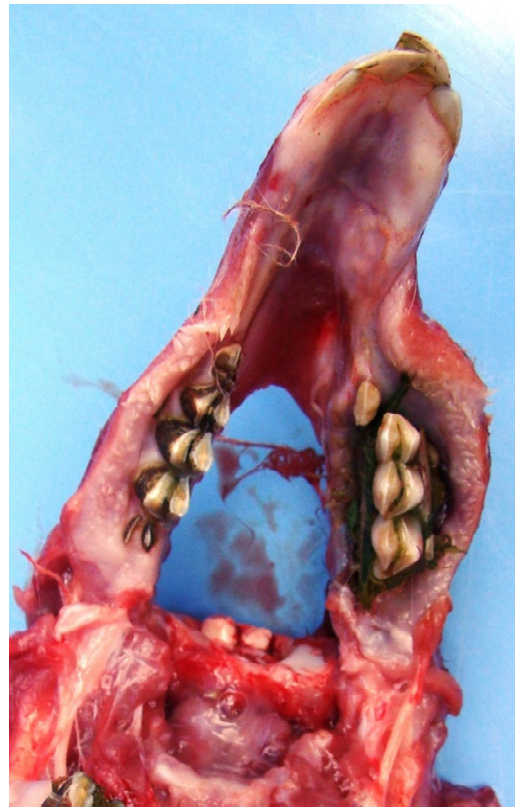


Fig. 18. Neoformación de tejido óseo cría.



Fig. 19. Piezas dentales rechazadas, porción basal descubierta e involucro con secuestros óseos y exudado purulento

4. 2. 2 Estudios Histopatológicos

La hiperostosis severa fue la lesión histológica del maxilar inferior más frecuente (25/30). Se caracterizó por áreas de necrosis licuefactiva piógena con abundantes PMNs y disgregación del tejido óseo, circundadas por tejido conectivo fibroso. Rodeando la lesión principal se observaron células mononucleares plasmáticas, vasos neoformados y tejido óseo alternado con áreas de necrosis formando cavidades y canales con espacios vacuolares de contorno indefinido y neoformación vascular de menor calibre (Figura 20). La osteítis rarefaciente de grado IV fue predominante y en segundo lugar seguidas de necrosis e involucro con secuestro (cuadro 5). Las lesiones necróticas presentaron infiltración masiva de PMNs, fibrina y leucocitos mononucleares en la periferia de la lesión. Las lesiones principales ocurrieron en los espacios medulares de la zona esponjosa e involucró a las trabéculas observándose además zonas necróticas en la corteza y periostio (Figura 21).

En la osteítis rarefaciente se observó infiltrado inflamatorio de células plasmáticas con predominancia de granulocitos y linfocitos en la zona medular ósea. Además, se observó ausencia de tejido adiposo en los espacios de médula estrechada y alteraciones de fibrosis, osteólisis y esclerosis masiva de hueso esponjoso con resorción y reabsorción

simultaneas, crecimiento óseo y aparente actividad osteoblástica (Figura 22) observándose además fragmentos óseos separados y revestidos aparentemente por osteoblastos con bordes irregulares de la trabécula (Figura 23).

La osteítis crónica presentó mayor necrosis licuefactiva piogénica con grandes cantidades de leucocitos PMNs, linfocitos linfoplasmocitos y células plasmáticas diseminadas. El espacio de la médula ósea y las trabéculas de hueso adyacente mostraron ausencia de tejido adiposo acompañado de un grado variable de fibrosis medular y formación de zonas escleróticas (Figura 24). La presencia de células de infiltración linfocíticas y plasmáticas dispersas, médula ósea fibrosada y trabéculas de hueso adyacente revestidas por los osteoblastos reactivos formaban “costuras” de naturaleza osteoide (Figura 25). La formación de hueso nuevo reactivo puede ser masiva y conducen a la esclerosis del hueso, en donde la actividad osteoblástica puede ser pronunciada y ocasionar mayor espacio en las trabéculas medulares; con la activación de los osteoclastos y los episodios repetidos de la formación de hueso reactivo. Se observó además, la formación de micro abscesos por la presencia de PMNs agregados en zonas demarcadas por fibrosis reactiva y otras células inflamatorias dispersas (Figura 26).

Cuadro 5. Porcentaje (%) y tipo de lesiones histológicas en el maxilar inferior de las alpacas (n=30) según grado.

Tipo de LESIONES	GRADO				n*	Porcentaje
	I	II	III	IV		
Hiperostosis	-	4	8	13	25	86.66
Osteítis rarefaciente	-	2	7	11	20	66.66
Necrosis	-	2	6	8	16	53.33
Involucro secuestro	-	-	3	8	11	36.66

n= número de animales

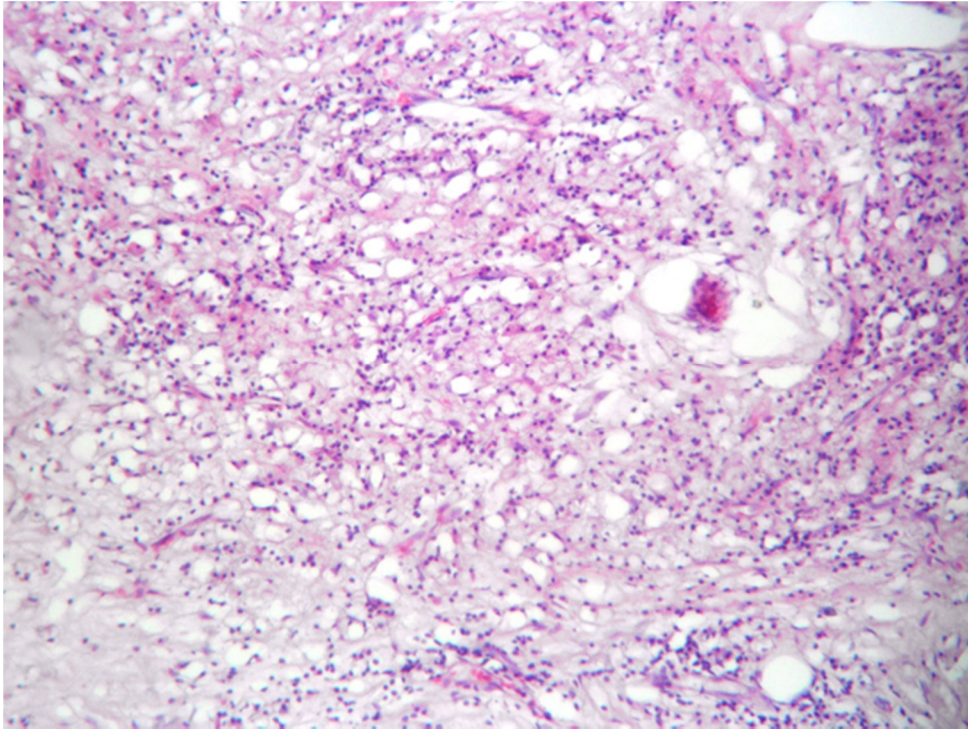


Figura 20. Tejido óseo necrosado con exudado inflamatorio denso infiltrado H&E x 5X.

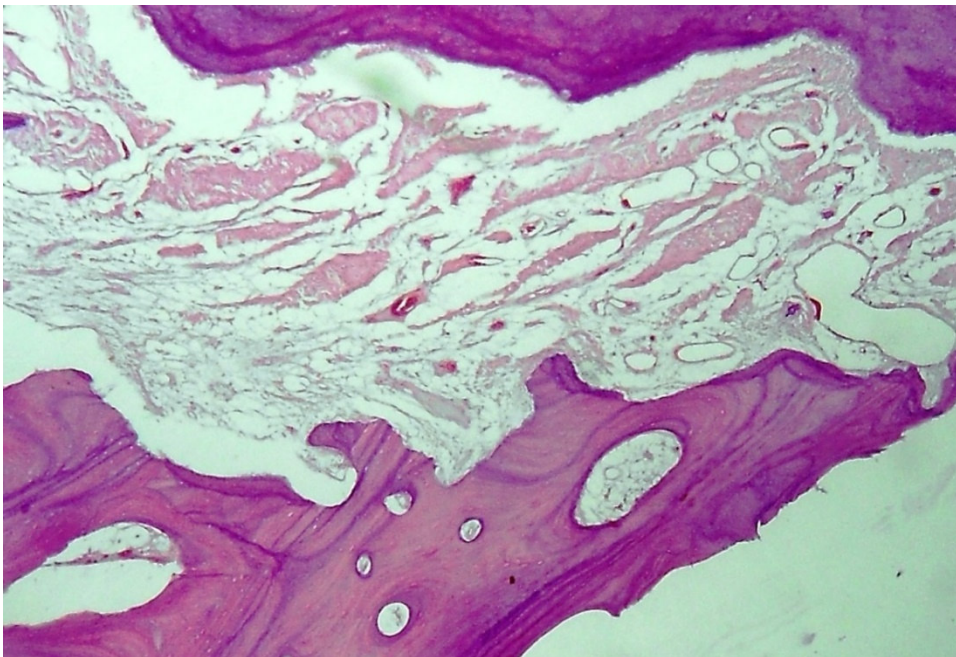


Figura 21. Trabéculas de contorno irregular y zonas adiposas deformadas H&E 10X

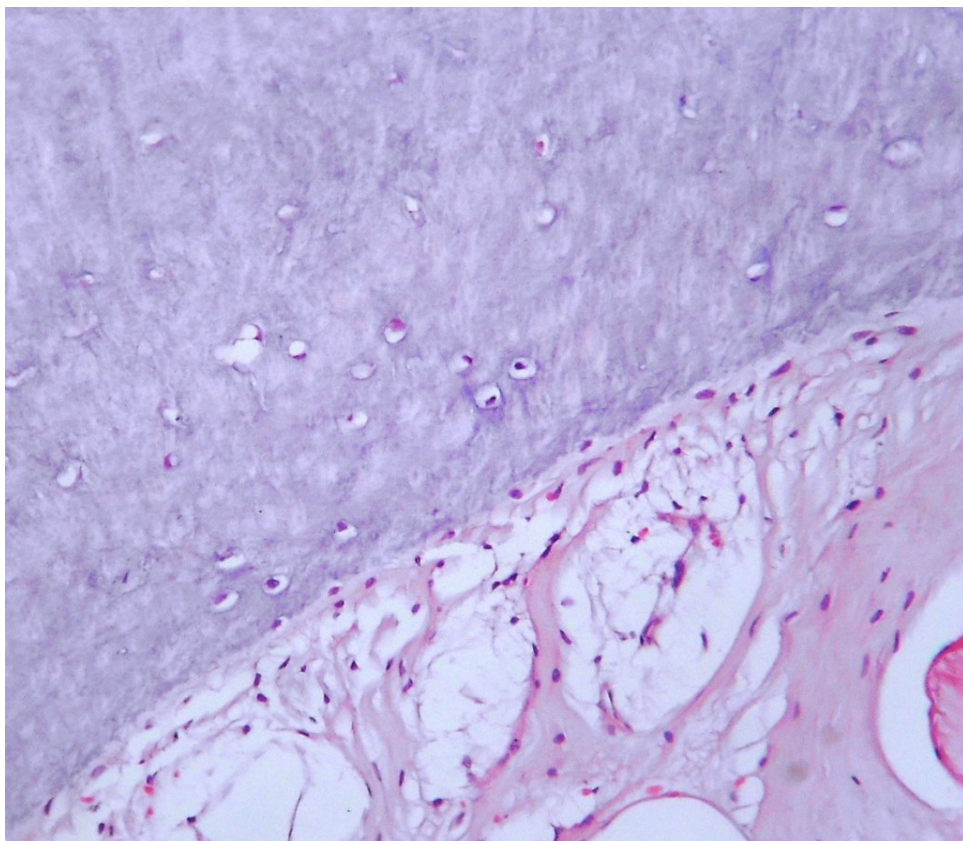


Figura 22. Crecimiento óseo con aparente actividad osteoblástica H&E 25X

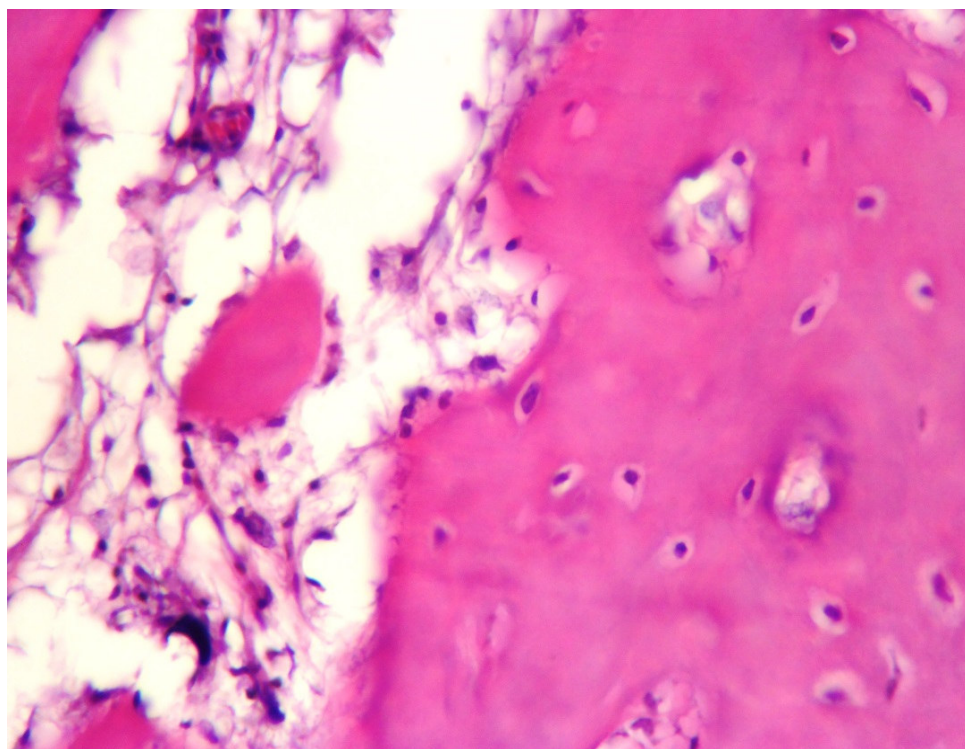


Figura 23. Fragmento óseo separado revestidos aparentemente por osteoblastos y bordes irregulares de la trabécula. H&E 40X

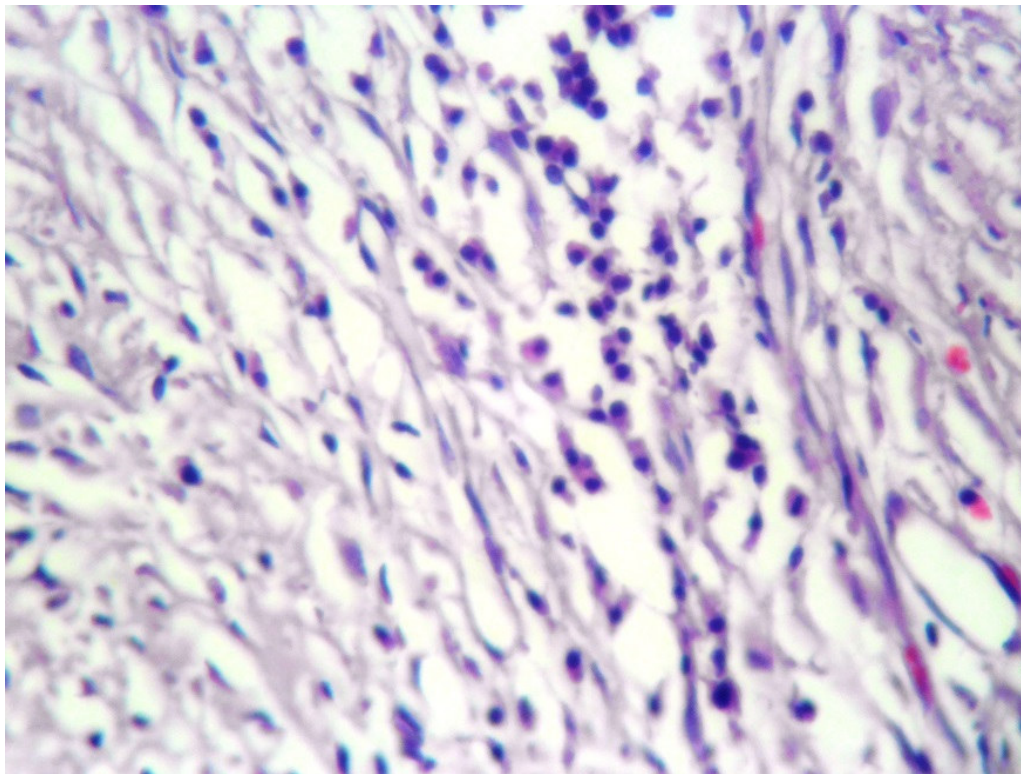


Figura 24. Presencia de plasmocitos, con tejido de granulación disperso. H&E 40X

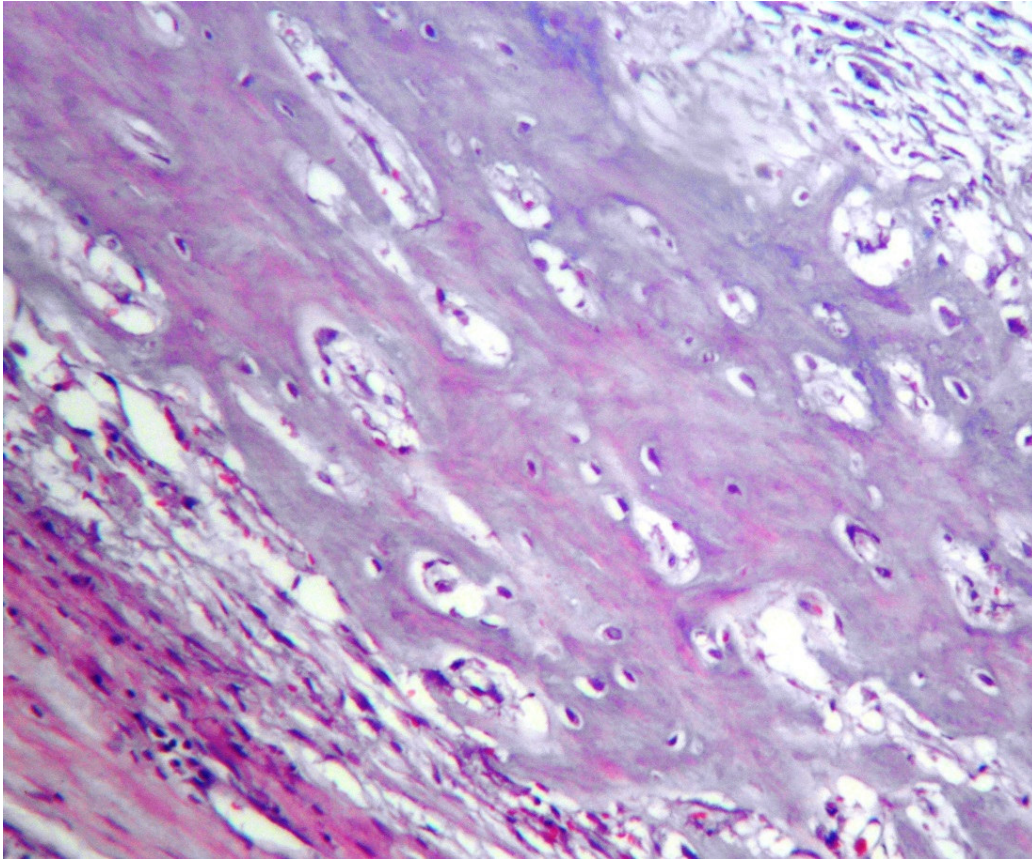


Figura 25. Formación reactiva de leve tejido de granulación pericondrostático. H&E 10X

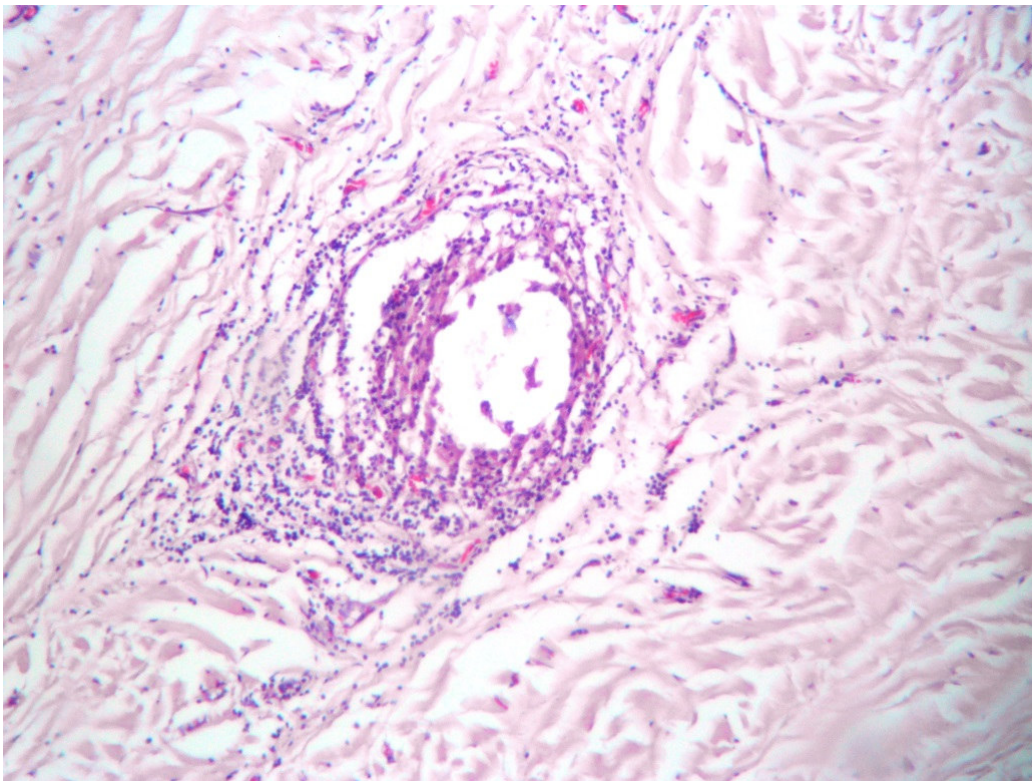


Figura 26. PMNs formando un micro absceso a nivel, óseo H&E 10X

4.3. Estudios Microbiológicos

Las bacterias halladas en la osteomielitis del maxilar inferior en alpacas fueron *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*,

Streptococcus viridans, *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Fusobacterium necrophorus* (Cuadro 6). Asimismo se determinó las características bioquímicas de las bacterias aisladas (Cuadro 7).

Las colonias de *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* en agar sangre se observaron de forma circular, superficie elevada o convexa, con márgenes enteros, lisas y blandas, color blanco opaco gris-, muy adheridas al agar, y crece en presencia o ausencia de CO₂, a las 72 horas a 37°C (Figura 27). Las bacterias eran Gram positivas y presentaron formas bacilares filamentosas ramificadas, que desarrollaron en medio tioglicolato y agar BHI (Figura. 28). Se observaron gránulos de azurófilos rodeados por bacterias filamentosas (Figura. 29)



Figura 27. Colonias de *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*

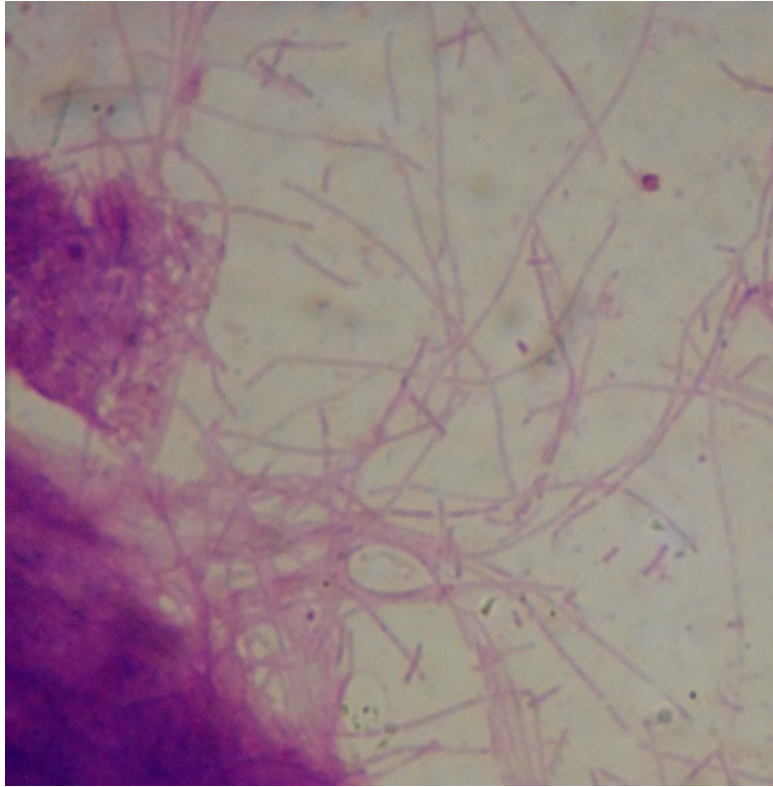


Figura 28. Bacterias de *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes*.

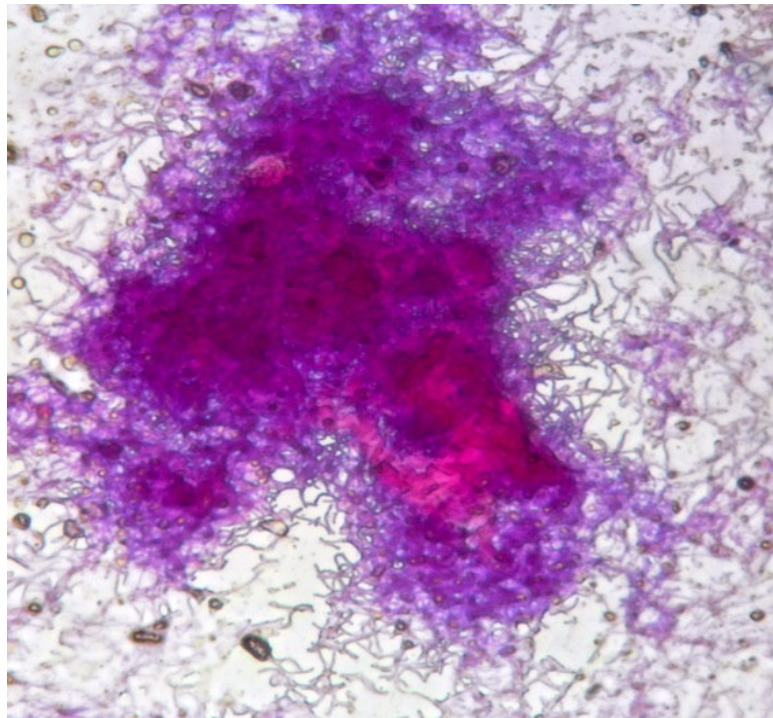


Figura 29. Granulo de azufre.

Cuadro 6. Frecuencia y porcentaje (n / %) de bacterias aisladas en la osteomielitis del maxilar inferior de alpacas adultas, tuis y crías.

Bacterias aisladas	Frecuencia / porcentaje		
	Adultos=21	tuis=6	Crias=3
<i>Arcanobacterium (Actinomyces)</i>			
<i>pyogenes</i>	20/95.2	5/83.3	2/66.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	20/95.2	6/100	2/66.7
<i>Streptococcus pyogenes</i>	21/100	6/100	3/100
<i>Streptococcus viridans</i>	21/100	6/100	3/100
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	12/57.1	3/50	1/33.3
<i>Fusobacterium necrophorus</i>	-	-	2/66.7

Cuadro 7. Características morfológicas y bioquímicas de bacterias aisladas del maxilar inferior de alpacas con osteomielitis

Características	Bacterias aisladas					
	<i>A. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. viridans</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>F. necrophorum</i>
Morfología	Bacilo	Coco	Coco	Coco	Bacilo	Bacilo
Tinción Gram	+	+	+	+	+	-
Hemolisis	α	-	B	α	-	A
Catalasa	-	+	-	-	+	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
Coagulasa	-	+	-	-	-	-
Movilidad	-	-	-	-	-	-
Glucosa	A				+	+ débil
Lactosa	+		+	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	+
Gelatina	-				+	-
Indol	-				-	+
Lipasa	-				+	+

Se observaron colonias de *Staphylococcus aureus*, cremosas amarillentas, de forma circular y superficie convexa con bordes redondeados, de consistencia mucosa y adherida al medio. Las colonias desarrollaron en 24 horas de incubación a 37°C (Figura 30), y a la observación microscópica las bacterias eran cocos Gram positivos que se agrupaban en pares o racimos (Figura 31).



Figura 30. Colonias *Staphylococcus aureus*.

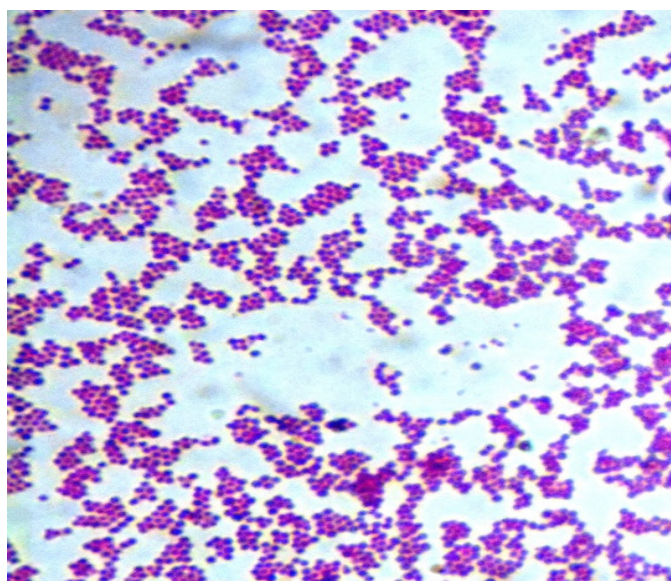


Figura. 31. Bacterias de *Staphylococcus aureus*.

Las colonias de *Streptococcus pyogenes* eran beta hemolíticas, mientras que las colonias de *Streptococcus viridans* eran alfa hemolíticas. Ambos tipos de estreptococos desarrollaron en agar sangre bajo aerobiosis durante 24 horas de incubación a 37°C (Figura 32). Morfológicamente las bacterias de los *Streptococcus pyogenes* eran cocos en cadenas cortas y diplococos (Figura 33), y las del *Streptococcus viridans* eran cocos ligeramente ovoides dispuestos en cadenas largas y diplococos (Figura 34).



Figura 32. Colonias *S. pyogenes* beta hemolíticas (Izquierda) y *S. viridans* alfa hemolíticas (Derecha)

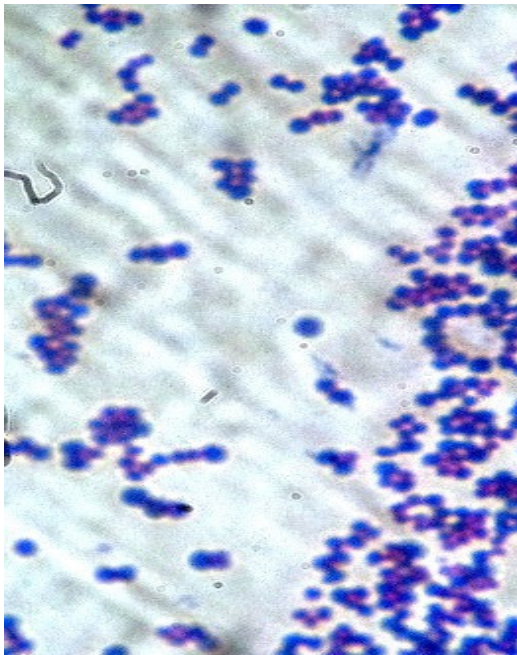


Figura 33. Bacterias de *Streptococcus*.
Pyogenes



Figura 34. Bacterias de *Streptococcus*
viridans

Las colonias de *Corynebacterium* desarrollaron lentamente a las 48 horas en aerobiosis en 24 horas de incubación a 37°C (Figura 35), son de color blancas opacas y están suavemente adheridas al medio. Las bacterias Gram positivas morfológicamente hacen agrupaciones angulares a manera de “letras chinas” y empalizadas, son (Figura. 36).

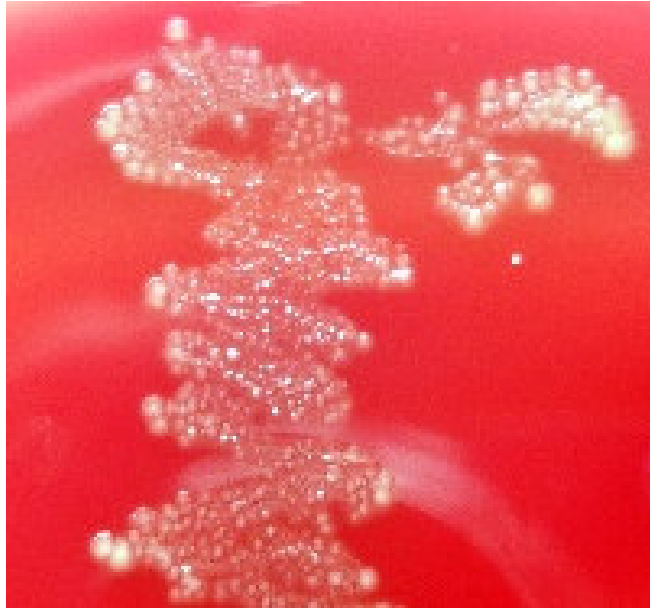


Figura 35. Colonias de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

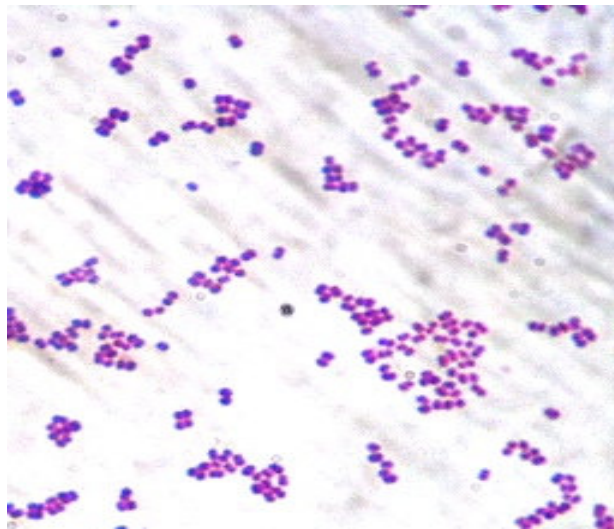


Figura 36. Bacterias de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Las bacterias *Fusobacterium necrophorum* desarrollaron en agar sangre incubada en anaerobiosis estricta a 37°C durante 72 horas. Eran colonias circulares englobadas de color blanco cremoso y aspecto mucoide (Figura 37). Microscópicamente se apreciaron como bacilos Gram negativos, alargados, ligeramente curvos con la punta lanceolada (Figura 38).

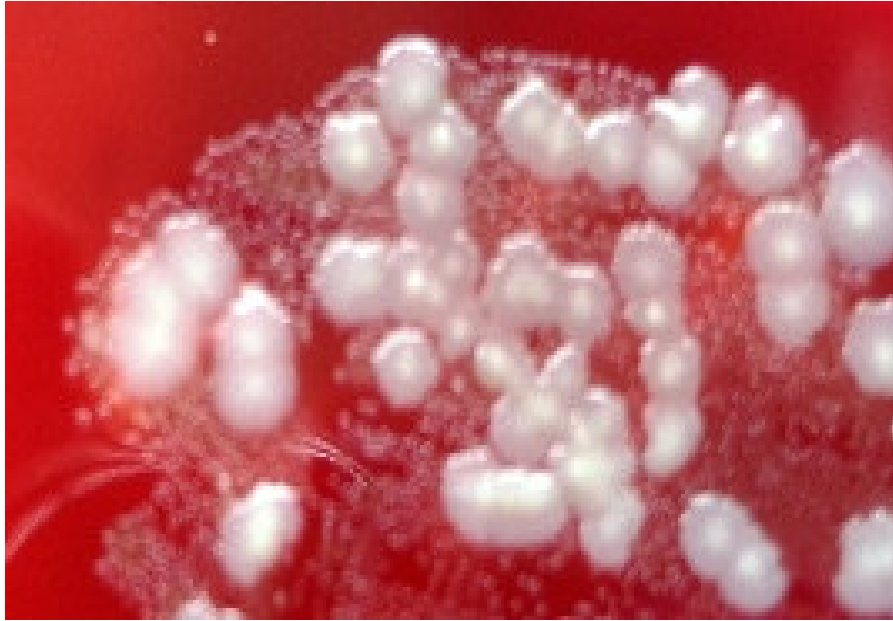


Figura 37. Colonias de *Fusobacterium necrophorum*

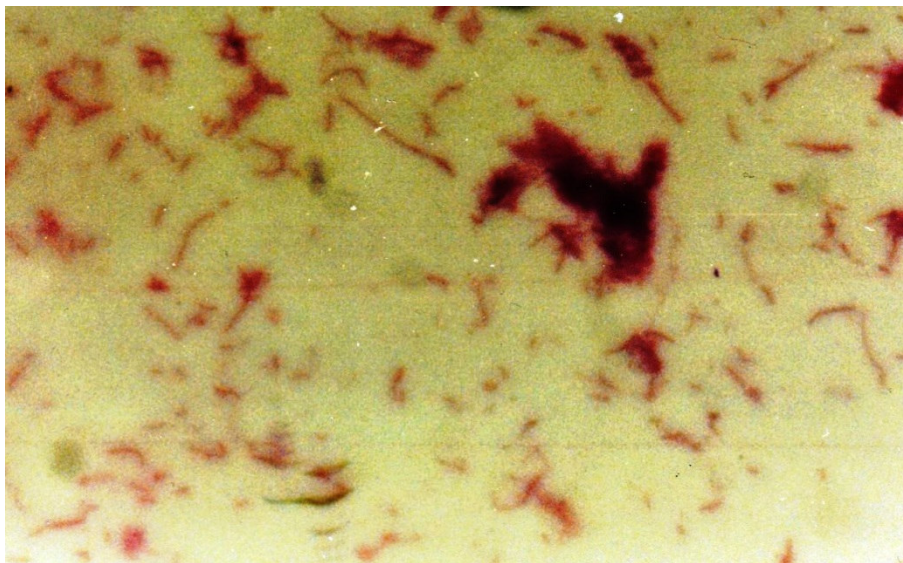


Figura 38. Bacterias filamentosas de *F. necrophorum*

V DISCUSION.

La osteomielitis en alpacas es una inflamación ósea progresiva ocasionada por bacterias de los géneros *Arcanobacterium* (*Actinomyces*), *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus* (Lovón, 1955, Moro 1956). La enfermedad se caracteriza por la presentación de lesiones de diferente grado mayormente en el maxilar inferior que se aprecian por palpación o visualmente como engrosamientos, tumoraciones submandibulares con o sin ulceraciones (Cuba, 1949). Esta enfermedad ocasiona severas pérdidas económicas en la crianza de alpacas debido a su carácter progresivo y debilitante, y por afectar a cualquier individuo incluyendo reproductores. En el presente estudio se evaluó la osteomielitis del maxilar de las alpacas mediante el examen clínico, patológico -macroscópico e histopatológico-, y microbiológico. Para este fin se evaluaron veintiuna alpacas adultas, seis tuis y tres crías que al momento del examen clínico presentaban osteomielitis de diverso grado.

En todos los casos se hallaron lesiones de osteomielitis exclusivamente en el maxilar inferior y más frecuentemente en el maxilar izquierdo que en el derecho. Las lesiones leves, fueron solo engrosamientos focalizados, mientras que las lesiones moderadas y graves fueron más bien multifocales con la presencia de ulceraciones y fístulas directamente relacionadas a la gravedad de la lesión. Para una mejor descripción de las lesiones encontradas en el presente estudio se ha dividido anatómicamente el cuerpo mandibular de la mandíbula inferior en tres partes: incisiva, edéntulo y molar con sus respectivas caras labial, bucal o lingual (Sato y Angulo, 2015). En los estudios histopatológicos la osteomielitis del maxilar inferior de la alpaca se apreció a cualquier edad como un proceso agudo, crónico primario y crónico secundario. Este proceso abarcó desde infiltrados inflamatorios, a una infiltración de células plasmáticas predominantemente acompañada de un grado variable de fibrosis de la medula con rarefacción ósea y sequestros con involucro en los casos graves. La osteomielitis del maxilar inferior observada en el presente estudio es una enfermedad polimicrobial ocasionada por *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*. En crías de alpacas, además de las bacterias antes mencionadas está involucrado el *Fusobacterium necrophorum*.

Clínicamente, se encontró que las lesiones leves eran menos frecuentes en alpacas adultas (3/21) que en tuis (4/6) y se hallaron en las caras bucal o labial del cuerpo mandibular del maxilar inferior izquierdo excepto en un tui en donde se halló una lesión en la cara labial del maxilar inferior derecho (cuadros 1 y 2). Según los resultados, la lesión leve inicia mayormente en el maxilar izquierdo, con el consiguiente proceso de leve a grave y la subsiguiente continuidad de la lesión hacia las áreas contiguas llegando por extensión inclusive al maxilar derecho. Esta afirmación se respalda con los resultados obtenidos aquí en donde la mayoría de lesiones de cualquier grado en adultos y tuis se localizaron en el maxilar inferior izquierdo (Cuadros 1 y 2). Según algunos autores, (Vadillo *et al.*, 2002; Clerc *et al.*, 2004; Niehaus, 2009) las infecciones periodontales se originarían en los espacios interalveolares del maxilar inferior y se agravan con el tiempo.

En alpacas adultas y tuis esto es provocado por pastos duros y aristas de las espigas barbadas; debido a que sus partes afiladas al penetrar en los tejidos del maxilar inferior, sea del cuerpo mandibular, el espacio edéntulo, la parte incisiva y molar, ocasionan la pérdida de continuidad del tejido sano y una necrosis primaria, esencial para el ingreso y desarrollo de gérmenes saprófitos o patógenos (Cuba, 1949; Moro, 1956; Pezo *et al.*, 1996; Fernández y Rosadio, 1998). Sin embargo, no se pudo explicar porque la mayor incidencia de la osteomielitis ocurre en el maxilar inferior izquierdo, ya sea inicial, llámese leve o avanzada, moderada a grave. Se podría postular que esta mayor incidencia es debida al movimiento masticatorio de los rumiantes en donde los pastos duros son mayormente prensados contra los molares del maxilar izquierdo.

En el maxilar inferior, el suministro de sangre durante el establecimiento de la osteomielitis aguda, crónica y secundaria es fundamental para explicar el desarrollo de la enfermedad. Luego de una lesión inicial, las bacterias patógenas viajan por los vasos sanguíneos donde se adhieren y reproducen causando una inflamación aguda (Baltensperger y Eyrich, 2009; Calhoun *et al.* 2009; Mustafá *et al.*, 2014). Entonces a causa de las trombosis vasculares, o bien de los reflejos vegetativos simpáticos y parasimpáticos se produce una vasoconstricción de los vasos mandibulares de tipo terminal, lo cual da origen y facilita la aparición de necrosis y secuestros mandibulares (Rodríguez, 2000): Estos mecanismos descritos en humanos, probablemente ocurran en alpacas debido a que la anatomía del maxilar inferior también presenta una vascularización capilar yuxtaterminal.

Una vez iniciada la enfermedad, ya sea vía hematógena o causado por una extensión local de una infección vecina, el proceso continúa con la invasión bacteriana profunda de la médula del hueso, lo que resulta en la acumulación de detritos y exudados inflamatorios. Este acúmulo incrementa la presión y reduce aún más el flujo sanguíneo capilar, ocasionando obstrucción y necrosis. La presión del exudado medular hace que este sea empujado a través de los conductos de Havers hacia los canales de Volkman alcanzando la corteza ósea (Rodríguez, 2000; Aguado, 2002; Monchez, 2013).

El estudio histológico corrobora lo observado en las lesiones macroscópicas a la necropsia. El engrosamiento y tumoración se observó como una hiperostosis severa muy frecuente, caracterizada por necrosis liquefactiva con disgregación de tejido óseo, circundadas por tejido conectivo fibroso neoformado. La osteítis rarefaciente fue predominante y en segundo lugar seguida de necrosis e involucro con secuestro (cuadro 5). Estas lesiones ocurrieron en los espacios medulares de la zona esponjosa e involucró a las trabéculas observándose además zonas necróticas en la corteza y periostio. Histológicamente, la osteomielitis del maxilar inferior se define como una enfermedad infecciosa supurativa del hueso, la cual puede ser hematógena o causada por una extensión local infecciosa vecina (Baltensperger y Eyrich, 2009).

En alpacas según los resultados de histopatología de la osteomielitis del maxilar inferior se plantea que el curso de la enfermedad va de aguda, crónica primaria y crónica secundaria porque abarca el alcance completo de infiltrados inflamatorios, desde el exudado inflamatorio mixto compuesto de fibrina, leucocitos PMNs y macrófagos en la etapa aguda, hasta una infiltración de células plasmáticas predominantemente acompañada de un grado variable de fibrosis de la medula durante los procesos de crónica primaria a crónica secundaria (Cuadro 5). Li *et al.*, (2008) corroboran experimentalmente que la osteomielitis aguda supurativa, se encuentra principalmente en los espacios medulares de la zona esponjosa que se llenan con PMNs, tejido necrótico y microorganismos pero secundariamente involucra las trabéculas y puede penetrar a la corteza y alcanzar el periostio. Esto mismo ocurrió en el presente estudio donde el tejido adiposo medular sufre necrosis y es sustituido por exudado inflamatorio.

La presión aumenta en el espacio medular y se destruyen los vasos sanguíneos, lo que se ha podido observar como resultado, una perfusión vascular que conduce a la necrosis de

la corteza y la zona esponjosa. Entonces, las trabéculas se tornan irregulares y los osteocitos que aparecen vacíos se agrandan y se necrosan. Además se observó la formación de secuestros con mayor frecuencia al ser colonizada con microorganismos formadores de placas bacterianas que perpetúan la inflamación y conducen a una osteomielitis crónica secundaria supurativa que dura más de un mes. Esta elevación perióstica que se manifiesta macroscópicamente como un engrosamiento inicialmente y luego como una tumoración es seguida por la nueva formación ósea que conduce a la formación de fístulas. La fibrosis de la medula sobrevendrá después de la presentación del factor de crecimiento del fibroblasto. Esta actividad osteoblástica puede ser pronunciada y conducir al mayor calibre óseo rodeando las trabéculas medulares. Con la activación de los osteoclastos y los episodios repetidos de la formación de hueso reactivo, un patrón irregular característico sobreviene continuando el proceso inflamatorio. Al final ocurre lo que se observó en este estudio: una esclerosis masiva de hueso esponjoso, acompañado por la nueva formación ósea perióstica y esclerosis cortical muy avanzada (Rodríguez, 2000; Calhoun *et al.*, 2009).

El cuadro morfológico de la osteomielitis crónica primaria se rige por reacciones mesenquimales de la médula ósea, por el infiltrado inflamatorio y alteraciones secundarias óseas como la osteólisis; el infiltrado inflamatorio se compone de células plasmáticas que pueden incluso ser predominantes. Los granulocitos forman una proporción variable, en su mayoría menor. También están presentes los linfocitos y los macrófagos. El edema de los espacios de la médula ósea puede ser un hallazgo prominente. Aunque no se ha encontrado el tipo de respuesta inflamatoria para predecir confiablemente el curso clínico de la enfermedad, sin embargo puede proporcionar una pista importante hacia la actividad de la enfermedad; la formación de micro abscesos neutrofílicos en la osteomielitis crónica esclerosante difusa de la osteomielitis crónica primaria son interpretados como señales de la fase activa de la enfermedad y correlacionaron bien como mezclas osteolíticas y osteoescleróticas los cuales son mencionados por Li *et al.*, (2008) y Baltensperger y Eyrich (2009).

La rarefacción ósea se caracterizó por formaciones de tractos cavitarios acompañados de disolución del tejido óseo sin regeneración evidente, en algunos casos como producto de una notoria osteomielitis acompañada por necrosis con contenido purulento. La presencia de involucro que a manera de cavidad ósea aloja a una porción de hueso necrótico llamado

secuestro, proceso patológico observado en el cuerpo mandibular, espacio edéntulo de las caras externa e interna y en la parte incisiva, en alpacas adultas, tuis y crías. La presencia de esta lesión indicaría procesos avanzados de osteomielitis del maxilar inferior. La histopatología en la osteomielitis crónica secundaria que cursa con supuración demuestra características similares de casos de osteomielitis aguda con grandes cantidades de leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y células plasmáticas, acompañadas de un grado variable de fibrosis de la medula y la formación de hueso reactivo.

En contraste con las lesiones leves encontradas en adultos y tuis, todas las crías examinadas tuvieron lesiones graves (3/3). Al respecto, Gutiérrez (2005) menciona que la osteomielitis hematógena aguda de humanos es vista más a menudo en los niños; debido a su rica fuente vascular. En principio, el maxilar en el lactante y en el niño de la segunda infancia está pleno de gérmenes dentarios atraídos por la gran inervación y sobre todo la gran irrigación vascular en las encías, y esto sería el punto de implantación de una osteomielitis hematógena o también por un proceso cutáneo de vecindad debido a una infección estafilocócica. Este es el hecho que explica que la osteomielitis en el maxilar del lactante, sea más aguda que en el adulto. En recién nacidos las bacterias que frecuentemente ocasionan las infecciones óseas son: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y los bacilos entéricos aeróbicos y excepcionalmente se han descrito infecciones por *Staphylococcus epidermidis*. En niños de mayor edad, el *Staphylococcus aureus* es el microorganismo más identificado, seguido por el *Streptococcus pyogenes* y el *Streptococcus pneumoniae* (Merino, *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2001, Gutiérrez, 2005).

Según varios autores, las bacterias aisladas con más frecuencia en crías de alpacas fueron *Fusobacterium necrophorus*, *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans* y *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cuba, 1949; Moro, 1956; Pezo *et al.*, 1996; Fernández y Rosadio, 1998). Estos reportes coinciden mucho con lo hallado en el presente estudio donde en dos (2/3) crías de alpacas examinadas se aisló el *Fusobacterium necrophorus* el cual estaría comprometido en una lesión inicial de tejido blando debido a que en los primeros meses de vida esta bacteria produce una estomatitis necrótica en las encías inferiores que es aprovechada por gérmenes de la flora bucal como el *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus viridans*, y especialmente el *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*

(Niehaus, 2009), los cuales fueron hallados con mayor frecuencia en las lesiones óseas (cuadro 8).

Para un diagnóstico definitivo de osteomielitis es necesario el aislamiento directo del organismo en una muestra clínica; sin embargo, por varias razones, la tasa de falla de aislamiento es mayor al 50%, entre ellas, el tratamiento previo con antibióticos, el sobre crecimiento concomitante de otros organismos o una metodología inadecuada (Santala *et al.*, 2004 y Bestetti, 1978). Las muestras clínicas más adecuadas son las muestras de pus, tejido o gránulos de azufre. Los hisopos no son ideales, ya que, a pesar de que pueden ser cultivados, la muestra inicial no puede ser analizada, y una tinción de Gram de la muestra suele ser más sensible que el cultivo, sobre todo si el paciente ha recibido antibióticos. En un laboratorio de microbiología clínica general, el organismo es identificado por la morfología de las colonias que crecen en el agar y por su perfil bioquímico.

Según los resultados del presente estudio, la osteomielitis en alpacas resulta de una infección polimicrobial que varió en incidencia según la clase de animal. Aunque en todos los animales estudiados se aisló *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus viridans*, estas bacterias son consideradas comensales saprófitos y son contaminantes de una herida inicial (Smego y Foglia, 1998; Acha y Szyfres, 2001). En contraste, *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, fueron aislados en la mayoría de alpacas adultas, tuis y crías y se consideran bacterias patógenas causantes de osteomielitis en bovinos (Vadillo *et al.*, 2002; Clerc *et al.*, 2004), y alpacas (Cuba, 1949; Moro y Guerrero, 1971; Pezo *et al.*, 1996). Además, en dos de las tres crías evaluadas se aisló también *Fusobacterium necrophorus* una bacteria comensal potencialmente patógena causante de estomatitis necrótica en alpacas (Moro y Guerrero, 1971; Fowler, 1995; Fernández y Rosadio 1998).

Corynebacterium pseudotuberculosis también fue aislado en un 50% de alpacas adultas y tuis, y en una cría en el presente estudio. Esta bacteria causante de linfangitis en ovinos (Batey 1986) y alpacas (Braga, *et al.*, 2006) se considera endémica de la zonas de crianza de alpacas del sur del Perú, lugar donde proceden los animales evaluados en este estudio. Aunque en ovinos y alpacas el modo de transmisión de *Corynebacterium pseudotuberculosis* es a través de heridas de esquila, en animales nunca esquilados es posible la transmisión de una alpaca con mastitis por *Corynebacterium*

pseudotuberculosis y la consecuente contaminación de la cavidad oral en la cría lactante (Braga, *et al.*, 2006).

La osteomielitis en alpacas se puede definir como una infección polimicrobial crónica, lentamente progresiva con características tanto supurativas como granulomatosas que generalmente afecta a tejidos blandos y hueso (Moro y Guerrero, 1971; Pezo *et al.*, 1996). *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* y *Fusobacterium necrophorus* son comensales endógenos orales en donde aparentemente se propagan a través de las barreras anatómicas por extensión directa o diseminación hematógena (Roeder *et al.*, 1989; Lew y Waldvogel, 2004; Valencia, 2008). Los microorganismos aislados en el presente estudio poseen diversos factores de virulencia que pueden estar directamente relacionados a la patogenia de la osteomielitis. Por ejemplo, *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* posee la enzima neuraminidasa, que utiliza para su adhesión a células epiteliales, colágeno, diversas proteínas extracelulares y a otras bacterias tales como *Streptococcus pyogenes*.

La neuraminidasa también impide la respuesta inmune del huésped, aumentando la susceptibilidad de la IgA de las mucosas a las proteasas bacterianas (Gibbons y Hay 1988; Drobni *et al.*, 2006). *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*, y *Corynebacterium pseudotuberculosis*, también poseen fimbrias involucradas en la adhesión a la fibronectina del huésped (Jost *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2011; Bicalho *et al.*, 2012). *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, y *Corynebacterium pseudotuberculosis*, poseen hemolisinas que favorecen la sobrevivencia bacteriana y ayudan a penetrar las barreras de defensa del huésped. Se trata de toxinas extracelulares responsables de la beta hemólisis de los cultivos con glóbulos rojos, son citotóxicas y químico-atrayentes para PMNs y macrófagos. Por ejemplo, el pyolysin (PLO) del *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* (Billington *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1997; Jost *et al.*, 2003), y la fosfolipasa C (PLD) del *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Braga, *et al.*, 2006; Batey, 1986).

En el presente estudio se pudo aislar los gránulos de azurófilos, compatible con los llamados gránulos de azufre, habiendo mayor predominio en alpacas adultas que en tuis y crías; estos gránulos están conformados por colonias bacterianas de *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* forman gránulos actinomicóticos, que se observan a la tinción de Gram como compuestos, densos basófilos de forma irregular filamentosos

ramificados, la presencia en alpacas adultas, posiblemente este asociada a la cronicidad de la enfermedad; estas estructuras también fueron observadas y mencionadas por Pine y Overman, (1963); Vadillo *et al.*, (2002); Murakami, (2014).

Los factores de virulencia de los microorganismos aislados están involucrados directamente en las lesiones por osteomielitis del presente estudio y actúan sinérgicamente aumentando la resistencia de los microorganismos a las defensas del huésped lo suficiente en el tiempo como para estimular la formación de un nuevo hueso e inducir la resorción ósea. (Asgary *et al.*, 2012). Las bacterias alcanzan el tejido óseo a través de la circulación sanguínea, desde un foco contiguo de la infección a través de un trauma penetrante. Entonces la osteomielitis aguda se convierte en crónica secundaria durante un espacio de tiempo La osteomielitis aguda y la osteomielitis crónica secundaria es la continuación de la misma enfermedad en diferentes etapas (Baltensperger y Eyrich 2009).

Las osteomielitis agudas y crónica secundaria se consideran infecciones óseas verdaderas que se acompañan con supuración regularmente extensa. La necrosis del hueso empieza limitando la posibilidad de erradicación de los patógenos y conduce a una condición crónica. Las bacterias expresan receptores de tipo adhesinas específicas para componentes de la matriz ósea, y además producen algunas moléculas que son capaces de interactuar con proteínas que intervienen en la cascada de la coagulación como fibrinógeno, colágeno, vitronectina, trombospondina y elastina (Lew y Waldvogel, 2004; Calhoun *et al.*, 2008).

VI CONCLUSIONES.

- La osteomielitis evaluada en alpacas cría, tui y adultos se presenta con lesiones óseas de diferente grado exclusivamente en el maxilar inferior y más frecuentemente en el maxilar izquierdo que en el derecho.

- En crías la osteomielitis del maxilar inferior fue predominantemente grave en donde el involucro y sequestro desarrolla en menor tiempo que en los tuis y adultos, debido posiblemente por una mayor vascularización en la mandíbula inferior.
- Las lesiones leves, fueron engrosamientos focalizados en el maxilar izquierdo, mientras que las lesiones moderadas y graves fueron multifocales en ambos maxilares inferiores con la presencia de ulceraciones y fístulas directamente relacionadas a la gravedad de la lesión.
- Histopatológicamente la osteomielitis del maxilar inferior de la alpaca es crónica supurativa; debido a un proceso agudo, crónico primario y crónico secundario. Que abarca desde infiltrados inflamatorios, a una proliferación de células plasmáticas predominantemente acompañada de un grado variable de fibrosis de la medula rarefacción ósea y sequestros con involucro en los casos graves.
- La osteomielitis del maxilar inferior observada en el presente estudio en alpacas adultas, tuis y crías es una enfermedad polimicrobial ocasionada por *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*, *Staphylococcus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*, cuyos gérmenes estuvieron relacionados a las lesiones macroscópicas y microscópicas
- En crías de alpacas, además de las bacterias antes mencionadas está involucrado el *Fusobacterium necrophorum*, presumiblemente asociado a la estomatitis necrotizante por ingestión de pastos duros lacerantes encontrados mayormente en épocas de sequía.

VII BIBLIOGRAFIA

1. Acha PN, Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales 3ra ed. USA: OPS. 4 p.
2. Aguado JM. 2002. Osteomielitis. *Medicine* 2002; 8(84):4525-4528
3. Ali K, Akram A, Akhtar MU. 2012. An unusual case of chronic suppurative osteomyelitis of the mandible. *Arch Orofac Sci* (2012), 7(1): 37-41.
4. Allen TD, Testa NG, Suda T, Schor SL, Onions D, Jarrett O, Boyde A. 1981. The production of putative osteoclasts in tissue culture ultrastructure, formation and behavior. *Scan Electron Microsc* (Pt) 3: 47 54.
5. Aparicio E.; Huerta A, Alba R., Tanarro P. 2007. Osteomielitis mandibular en canguro gris. *RCCV* Vol. 1 (2): 76-83
6. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms Properties, regulation and roles in human disease. *Landes Bioscience. Virulence* 2:5, 445-459.
7. Asgary S, Eghba MJ, Ehsani S, Eslami B. 2012. An Unusual Finding of Proliferative Periostitis in a Child: a Case Report. *International Journal of Stomatological Research*. 1(1): 1-5
8. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves D, 1998. IL-1 and TNF Antagonists Inhibit the Inflammatory Response and Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Journal of Immunology* 160: 403–409.
9. Baltensperger M, Eyrich KG. 2009. Osteomyelitis of the Jaws. 1ra ed. Berlin: 39
10. Barne, D. y Brothwell. 1987. Close encounters with an Osteoclast. *Science*, 236: 914-916.
11. Batey R. G., 1986. Frequency and consequence of caseus lymphadenitis in sheep and lambs at a Western Australian abattoir. *Am. J. of Vet Res.* 47:482-485.
12. Bestetti G. 1978. Morphology of the “Sulphur Granules” (Drusen) in Some Actinomycotic Infections. A Light and Electron Microscopic Study. *Vet. Pathol.* 15: 506-518.
13. Bicalho ML. Machado VS. Oikonomou G. Gilbert RO, Bicalho RC. 2012. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorus*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Veterinary Microbiology* 157: 125–131

14. Billington SJ, Jost BJ, Cuevas WA, Bright KR, Songer JG. 1997. The Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes Hemolysin, Pyolysin, Is a Novel Member of the Thiol-Activated Cytolysin Family. Journal of Bacteriology. 6100–6106.
15. Blood J. y Radostits. D. 1986. Medicina Veterinaria 7º ed., Ed. Interamericana México. p. 486, 766.
16. Braga, W.U.; Chavera, A. and Gonzalez, A. 2006. Corynebacterium pseudotuberculosis infection in highland alpacas (Lama pacos) in Peru. Vet. Rec. 159: 23–24
17. Brecher SM, Van Houte J, Hammond BF. 1978. Role of Colonization in the Virulence of *Actinomyces viscosus* Strains T14-Vi and T14-Av. Infection and immunity 22(2): 603
18. Calhoun JH, Sexton DJ, Shirtliff ME. 2008. Hematogenous osteomyelitis in adults. This topic last updated 16 (2): 1-7
19. Calhoun JH, Manring, MM, Shirtliff M. 2009. Osteomyelitis of the Long Bones. Seminars in plastic surgery 23(2): 59-72
20. Cierny G, Mader J, Penninck J. 1985. A Clinical Staging System for Adult Osteomyelitis. Clinical Orthopaedics and Related Research.414: 1-24
21. Clerc K, Cordero F, Saldivia CM, Vásquez LA, García ML.2004. Abscesos Faciales Producidos Por *Actinomyces pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) en un toro Senepol. Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 45(1): 1-8.
22. Cuba. A. 1949 Osteomielitis del maxilar inferior en alpacas. Rev. Fac. Veterinaria Lima. 4:25-48.
23. Drobni, M† Li T1† Kruger C, Loimaranta V, Kilian M, Hammarstrom L, Jornvall H, Bergman T, Stromberg N. 2006. Host-Derived Pentapeptide Affecting Adhesion, Proliferation, and Local pH in Biofilm Communities Composed of Streptococcus and Actinomyces Species. Infection and immunity, Vol. 74, No. 11, p. 6293–6299
24. Fernández, M. y Rosadio, R. 1998. Osteomielitis vertebral en alpacas RIP del IVITA de la Fac, de Medicina Veterinaria de la UNMSM, Lima Vol. 2. Nro. Extraordinario. 2:54-58.
25. Fernández-Tresguerres I, Alobera MA, Pingarrón M, Blanco L. 2006. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal; 11: E47-51.

26. Fowler M. 1995. Medicine and surgery of South American camelids: Llama, alpaca, vicuña and guanaco. 1st. Ed. Iowa State University Press, USA. p. 124 – 125, 192-195.
27. Franco E, Pezo D, García W. 1998. Gestión de centros de producción de reproductores de alpacas y llamas. Pub. Tec. FMV N° 37
28. Garg B. 2013. Pediatric osteoarticular infections. Pb Journal of Orthopaedics Vol- XIV, No.1-5
29. Garrity G, Winters M, Searles D. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotic genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2da Ed. U.S.A. p. 206.
30. Gasque R. 2008. Enciclopedia bovina. UNAM. FMVZ. Mexico. P 88.
31. Gibbons RJ, Hay DI, Cisar JO, Clark WB. 1988. Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect. Immun.* 56(11):2990.
32. Gibbons RJ, Hay DI. 1988. Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect. Immun.* 56(2):439.
33. Gutiérrez K. 2005. Bone and Joint Infections in Children. *Pediatr Clin N Am* 52 (2005) 779– 794.
34. Hall V, Stubbs SJ, Duerden BI. 2001. Identification of Clinical Isolates of *Actinomyces* Species by Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis. *Journal of clinical microbiology* Vol. 39(10): 3555–3562.
35. Humanson, G.F. 1967. Animal tissue techniques. 2da ed., W. H. Free man and Company, San Francisco.
36. Jost BH, Trinh HT, Songer JG, Billington SJ. 2003. Immunization with genetic toxoids of the *Arcanobacterium pyogenes* cholesterol-dependent cytolysin, pyolysin, protects mice against infection. *Infection and immunity*. Vol. 71, No. 5: 2966–2969.
37. Jost BH, Billington SJ. 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek* 88:87–102.
38. Jubb K, Kennedy P, and Palmer N. 1993. Pathology of domestic animals. 4th Ed. Academic Press, California. 1:101-109.
39. Kohli SS, Kohli VS. 2011. Role of RANK-L–RANK/osteoprotegerina molecular complex in bone remodeling and its immunopathology implications. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 15 (3).

40. Krieg N, Holt, J. 1984. Bergey's manual de systematic bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore/London.
41. Labbe JL, Peresa O, Leclair O, Goulona R, Scemama P, Jourdel F, Menager C, Duparcc B, Lacassind F. 2010 Acute osteomyelitis in children: The pathogenesis revisited. *Orthopedics & Traumatology: Surgery & Research.* 96, 268—275
42. Lazzarini L, Lipsky BA, Mader JT. 2005. Antibiotic treatment of osteomyelitis: what have we learned from 30 years of clinical trials? *International Journal of Infectious Diseases.* 9: 127—138
43. Lechevalier M, Lechevalier H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Journal of Systematic Bacteriology.* Vol. 20: 435-443
44. Lew D, Waldvogel FA. 2004 Osteomyelitis. *Lancet* 2004; 364: 369–379
45. Li D, Gromov K, Søballe K, Puzas JE, O'Keefe RJ, Awad H, Drissi H, and Schwarz EM. 2008. A quantitative mouse model of implant-associated osteomyelitis and the kinetics of microbial growth, osteolysis and humoral. *J Orthop Res.* 26(1): 96–105.
46. Lovón E. 1995. Contribución al estudio de las enfermedades infecciosas de las alpacas, germenais aislados de abscesos y osteomielitis de la mandibular. Tesis Bachiller. Lima Fac Med Vet. P 22.
47. Marais LC, Ferreira N, Aldous C, Roux. TLB. 2013. The pathophysiology of chronic osteomyelitis. *Journal of Orthopaedics.* 12(4):14.
48. Marín, M, Esteban J, Meseguer MA, Sanchez-Somolinos M. 2010. Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28(8):534–540
49. Merino JM, Carpintero I, Marrero M, Ansó S, Elvira AI, Iglesias G. 2001 Osteomielitis aguda: características clínicas, radiológicas, bacteriológicas y evolutivas. *An Esp Pediatr.* 55: 20-24
50. Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T. 2009. Identification of cell cycle – arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J. Cell Biol.* Vol. 184 No. 4 541–554
51. Monchez MF. 2013. Caracterización clínico-epidemiológica de la osteomielitis y artritis séptica en niños de 0 a 12 años atendidos en el hospital nacional de niños Benjamín bloom durante el período enero de 2006 a diciembre de 2010. Tesis de

- Medicina Pediátrica. Universidad De El Salvador Facultad De Medicina Escuela De Medicina. 155-157 p.
52. Moro M, Guerrero C. 1971. La Alpaca. Enfermedades infecciosas y parasitarias. Bol. Div. N° 8. Cl. IVITA: 23-24.
 53. Moro M. 1956. Contribución al estudio de las enfermedades de los auquénidos: Osteomielitis del maxilar inferior de las alpacas. Rev. Med. Vet. Lima. VII. pp: 62-80)
 54. Morrison JRA, Tillotson GS. 1988. Identification of *Actinomyces* (*Corynebacterium*) *pyogenes* with the API 20 Strep System. Journal of Clinical Microbiology. 1865-1866.
 55. Murakami K, Hata E, Hatama S, Wada Y, Ito M, Ishikawa, Kadota K. 2014. Eosinophilic Granuloma with Splendore-Hoeppli Material Caused by Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* in a Heifer. J. Vet. Med. Sci. 76(6): 931–935
 56. Mustafá M, Yusof S, Iftikhar M. 2014. Osteomyelitis: Pathogenesis, Clinical and Therapeutic Challenge. International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences Vol. 4, Issue 1, 9-18
 57. Niehaus A, 2009. Dental Disease in Llamas and Alpacas. Vet Clin North Am Food Anim Pract. Jul; 25(2):281-293.
 58. Page RC. 1991. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. Journal of Periodontal Research, 26: 230–242.
 59. Peña T, Delgado A, Martínez Y. 2007. Nociones actuales sobre la flora microbiana del surco gingival. En: III Congreso del PCC Matanzas: Facultad de Ciencias Médicas. Clínica Estomatológica.
 60. Pezo, D.; García, W.; y Franco, E. 1996. Examen anátomo patológico de la osteomielitis en alpacas. En: XIX Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. Cusco Perú p 70.
 61. Pezo D, Franco E, Franco F, Alarcón V. 2014. Sanidad en camélidos. En Manual del alpaquero 2da ed. Perú. Soluciones prácticas: p 12-45
 62. Pine L, Overman JR. 1963. Determination of the structure and composition of the sulphur granules of *Actinomyces bovis*. J. gen. Microbiol. 32, 209-223
 63. Pritt B, Mount, SL, Cooper K, Blaszyk H. 2006. Pseudoactinomycotic radiate granules of the gynaecological tract: review of a diagnostic pitfall. J. Clin Pathol 2006; 59: 17–20.

64. Ramírez A, Franco E, Pezo D, García W. 1998. Diagnóstico y control de enfermedades en camélidos sudamericanos. Pub. Tec. FMV. N° 34. pp: 27-29).
65. Ramírez, A. 1991. Enfermedades infecciosas. En avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Cap. VII. Ed. Fernández Baca, S. Editorial Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile.
66. Ramos CP, C, Foster G, Collins M. 1997. Phylogenetic Analysis of the Genus *Actinomyces* Based on 16s rRNA Gene Sequences: Description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology: p. 46-53
67. Reddy CA, Cornell CP, Fraga AM, 1982. Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Ebersson to the Genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov-t. Vol. 32(4): 419-429
68. Reyes R, H; Navarro R, P; Jiménez L, E y Reyes B, H. 2001. Osteomielitis: Revisión y Actualización. *Revista de la Facultad de Medicina*, vol.24, n.1, pp. 47-54.
69. Rodríguez OL. 2000. Osteomielitis. Tesis para Especialista de II grado en Cirugía Maxilo Facial. Filial Universitaria Este De La Habana. 15 p.
70. Roeder BL, Chengappa MM, Lechtenberg KF, Nagaraja TG, Varga GA.1989. *Fusobacterium necrophorus* and *Actinomyces pyogenes* associated facial and mandibular abscesses in blue duiker. *Journal of Wildlife Diseases*. 25(3): 370-377
71. Romero MC, Mas M, Giachetto G, Algorta G, Pérez MC, Cúneo A, Schimchak M. 2008. Etiología y presentación clínica de las infecciones osteoarticulares en niños hospitalizados en el Hospital Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell 2003-2005. *Rev Med Urug*; 24: 238-245
72. Ruhl S, Cisar JO, Sandberg AL. 2000 Identification of Polymorphonuclear Leukocyte and HL-60 Cell Receptors for Adhesins of *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces naeslundii*. *Infection and immunity*. 68 (11): 6346–6354.
73. Santala AN, Sarkonen N, Hall V,3 Carlson P, Jousimies-Somer H, Kononen E. 2004 Evaluation of Four Commercial Test Systems for Identification of *Actinomyces* and Some Closely Related Species. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 42, No. 1: 418–420

74. Sarkonen N, Könönen E, Summanen P, Könönen M, Jousimies-Somer H. 2001. Phenotypic Identification of Actinomyces and Related Species Isolated from Human Sources. *J. Clin. Microbiol.* 39(11):3955.
75. Sato A, Angulo J. 2015. Atlas de osteología de la alpaca adulta. Perú. Laboratorio de Anatomía Animal y Fauna Silvestre FMV - UNMSM
76. Schaal K, Yassin A, Stackebrandt E. 2006. The Family Actinomycetaceae: The Genera *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*, *Varibaculum*, and *Mobiluncus*. *Prokaryotes* 3:430–537.
77. Seaton A, Malizos KN, Viale P, Gargalianos-Kakolyris P. 2013. Daptomycin use in patients with osteomyelitis: a preliminary report from the EU-CORESM database. *J Antimicrob Chemother* 68: 1642–1649.
78. Serrano JA, Sandoval AH, Trujillo. 2005. Identificación y diagnóstico de Actinomicetales patógenos. 1er ed. Mérida: Editorial Venezolana C. A. 256 p.
79. Slauson D. y B. Cooper. 2002. Mechanisms of disease. A Textbook of Comparative General Pathology. Chapter 2 Disease at the cellular level. Ed. Mosby, p 34-73.
80. Smego RA, Foglia G. 1998. State of the art clinical article. *Clinical Infectious Diseases*. 26:1255–1261.
81. Somayaji SN, Mahnaz SR, Sahraei, Marriott I, Hudson MC. 2008. *Staphylococcus aureus* Induces Expression of Receptor Activator of NF- κ B ligand and prostaglandin E₂ in infected murine osteoblasts. *Infect. Immun.* 76(11):5120–5126.
82. Thomson RG. 1978. General veterinary pathology. 1ra ed. Philadelphia. W. B. Saunders Company: 152 p.
83. Vadillo; S. Píriz; S. Mateos 2002. Géneros *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Dermatophilus*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Actinobaculum* y *Arcanobacterium* En: Manual de microbiología veterinaria Hermoso de Mendoza JS, Píriz S. 2da ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 465 p.
84. Valencia IK. 2008. Evaluación de medios de cultivo para el aislamiento de *Streptococcus pyogenes* en paciente con diagnóstico clínico de faringo amigdalitis que acuden al laboratorio de Seladis durante los meses de julio a diciembre del 2008. Tesis de especialista en diagnóstico de laboratorio en salud, mención microbiología. La Paz Universidad. Mayor de San Andrés. -59 p.

85. Vergidis P, Rouse MS, Euba G, Karau MJ, Schmidt SM. 2011. Treatment with Linezolid or Vancomycin in Combination with Rifampin Is Effective in an Animal Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Foreign Body Osteomyelitis, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 55: 1182–1186.
86. Wu Ch, Mishra,A, Yang J, Cisar JO, Das A, Ton-That H. 2011 Dual function of a tip fimbrillin actinomyces in fimbrial assembly and receptor binding *journal of bacteriology*.193(13): 3197–3206.
87. Yamazaki K, Nakajima T, Ohsawa Y, Tabeta K, Yoshie H, Sakurai K, Seymour GJ. 2000. Selective expansion of T cells in gingival lesions of patients with chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol*; 120:154-161.